

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

---

**TESIS DOCTORAL**

---

**MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA  
EN CÁNCER DE RECTO TRATADO CON  
QUIMIO-RADIOTERAPIA NEOADYUVANTE:  
PAPEL DE *TREFOIL FACTOR 3* COMO  
POTENCIAL DIANA TERAPÉUTICA**

**Memoria presentada para la obtención del grado de  
Doctor Europeo en Medicina por  
Víctor Moreno García**

**Dirigida por el Dr. Enrique Casado, la Dra. Paloma Cejas  
y el Dr. Jaime Feliu**



**MADRID, 2013**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

---

**TESIS DOCTORAL**

---

**MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
GÉNICA EN CÁNCER DE RECTO  
TRATADO CON QUIMIO-RADIOTERAPIA  
NEOADYUVANTE: PAPEL DE *TREFOIL*  
*FACTOR 3* COMO POTENCIAL DIANA  
TERAPÉUTICA**

---

**Memoria presentada para la obtención del grado de Doctor Europeo en  
Medicina por Víctor Moreno García**

**Dirigida por el Dr. Enrique Casado, la Dra. Paloma Cejas  
y el Dr. Jaime Feliu**

**MADRID 2013**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**FACULTY OF MEDICINE**

**DEPARTMENT OF MEDICINE**

---

**DOCTORATE THESIS**

---

**MODIFICATION OF GENE EXPRESION  
IN RECTAL CANCER TREATED WITH  
NEOADJUVANT CHEMO-  
RADIOTHERAPY: ROLE OF TREFOIL  
FACTOR 3 AS A POTENTIAL  
THERAPEUTIC TARGET.**

---

**Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the Degree of  
European Doctor by Victor Moreno García**

**Directed by Dr. Enrique Casado, Dr. Paloma Cejas and Dr. Jaime Feliu**

**MADRID 2013**



**D. Enrique Casado, Doctor en Medicina y Jefe de Sección de Oncología Médica del  
Hospital Infanta Sofía**

**D<sup>a</sup> Paloma Cejas Guerrero, Doctora en Ciencias Químicas en la Universidad  
Autónoma de Madrid**

**y**

**D. Jaime Feliu, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La  
Paz y Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid**

**Certifican:**

**Que Víctor Moreno García ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo titulado  
"Modificación de la expresión génica en cáncer de recto tratado con quimio-  
radioterapia neoadyuvante: papel de *trefoil factor 3* como potencial diana  
terapéutica"**

**para optar al grado de Doctor Europeo en Medicina.**

**Dicho trabajo reúne, a nuestro juicio, las condiciones de originalidad y rigor  
necesarios, y por tanto, avalamos su presentación para ser juzgado.**

**Para que conste, firmamos el presente certificado en:**

**Madrid, a 29 de febrero de 2013**

**Dr. Jaime Feliu**

**Dra. Paloma Cejas**

**Dr. Enrique Casado**





# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	11
SUMMARY .....	15
1. INTRODUCCIÓN .....	19
1.1. Epidemiología .....	20
1.2. Historia natural .....	23
1.3. Biología molecular .....	24
1.3.1. Alteraciones genéticas específicas. ....	25
APC .....	26
β-catenina.....	27
KRAS .....	28
TP53 .....	29
PI3K .....	29
TGFβ .....	29
1.4. Estadificación.....	30
Ecografía endorrectal .....	30
Resonancia magnética nuclear .....	31
Tomografía axial computerizada.....	31
Tomografía por emisión de positrones .....	31
Evaluación patológica del tumor .....	32
1.5. Tratamiento .....	33
Tratamiento del estadio I .....	34
Tratamiento de estadios II y III.....	34
7Tratamiento del estadio IV .....	39
1.6. Factores pronósticos y predictivos.....	39
Antígeno carcinoembrionario .....	40
Margen de resección circunferencial y grado de regresión tumoral .....	40
Inestabilidad de microsatélites (MSI).....	40
Biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento neoadyuvante .....	40
Biomarcadores específicos de tratamiento.....	44
Técnicas moleculares no dirigidas .....	46
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	53
2.1 Hipótesis del trabajo .....	53
2.2 Objetivos del trabajo .....	53

<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
3.1. Pacientes y muestras clínicas .....	57
3.2. Genes.....	59
3.3. Procesamientos de las muestras.....	61
3.3.1 Aislamiento del ARN total.....	61
3.3.2 Síntesis del ADN complementario .....	61
3.3.3. Reacción de PCR cuantitativa.....	62
3.3.4 Inmunohistoquímica .....	62
3.4. <i>In vitro</i> .....	63
3.4.1 Cultivos celulares y transfección del vector de TFF3 .....	63
3.4.2 Extracción de RNA e hibridación de microarrays. ....	63
3.5. Estadística .....	64
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
4.1 Datos clínicos.....	67
4.2 Cambios dinámicos en la expresión génica .....	73
4.3 Impacto pronóstico de los genes modificados por el tratamiento. ....	73
4.4 Análisis inmunohistoquímico de TFF3 .....	78
4.5 Estudio de sensibilidad in vitro de células transfectadas con TFF3.....	83
4.6 Cambios en la expresión génica en células DLD-1 inducidos por TFF3.....	85
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>91</b>
5.1 Datos Clínicopatológicos .....	91
5.2 Metodología .....	94
5.2.1 Muestras clínicas .....	94
5.2.2 Estudio <i>in vitro</i> .....	95
5.2.3 Genes seleccionados .....	96
5.3. Discusión sobre los resultados .....	97
5.3.1 Cambios en la expresión génica inducidos por la quimio-radioterapia.....	97
5.3.2 Regulación de TFF3 como factor pronóstico .....	105
5.3.3 Estudio funcional de TFF3 <i>in vitro</i> .....	108
5.3.4 Implicaciones futuras de los resultados.....	112
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>117</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>117</b>

<b>7.</b>	<b>APÉNDICE .....</b>	<b>121</b>
<b>7.1.</b>	<b>Artículos Publicados Relacionados con la Línea de Investigación en Revistas Internacionales.....</b>	<b>121</b>
<b>7.2.</b>	<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>161</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>163</b>



## AGRADECIMIENTOS

Resultaría imposible realizar un trabajo de investigación en oncología sin la participación de un equipo multidisciplinar. Este estudio es fruto del tiempo y esfuerzo de muchas personas, que realizan una labor investigadora prácticamente altruista. Que sacan tiempo de los ratos libres que permite la presión asistencial y cuyo esfuerzo es, a menudo infravalorado.

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Enrique Casado por haber confiado en mí para colaborar en este emocionante proyecto. Desde que era residente pude compartir su interés por la investigación y aunque a veces la vida ponga trabas, siempre he tenido su apoyo incondicional.

A la Dra. Paloma Cejas por ser la columna sobre la que asienta este trabajo y ser un ejemplo para cualquier investigador por reunir la capacidad de esfuerzo, estudio, análisis y objetividad tan necesarios en este ámbito.

Al Prof. D. Manuel González Barón por haber impulsado la investigación oncológica en el Hospital La Paz y a su sucesor, Dr. Jaime Feliu, Jefe de Servicio, por ser un estímulo constante para no dejarla de lado.

Al Prof. José Javier Sánchez, por su ayuda inestimable en las explicaciones del método estadístico. Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital La Paz, por su colaboración, especialmente al Dr. Javier Larrauri.

A los todos los médicos de los servicios de Cirugía General y Oncología Radioterápica del Hospital La Paz, por colaborar día a día en el cuidado de estos enfermos, y en la investigación de forma desinteresada. En especial al Dr. Damián García Olmo por su implicación en esta patología y hacer que las discusiones multidisciplinarias sean un ejemplo de colaboración.

A todos mis compañeros del servicio de Oncología Médica del Hospital La Paz: médicos adjuntos, residentes, enfermeras, auxiliares y secretarias, por el apoyo que me han transmitido a lo largo de estos años. En especial a la Dra. Blanco por haber comenzado tan brillantemente el trabajo que yo he continuado.

A todo el personal del Servicio de Oncología Traslacional de nuestro Servicio, especialmente a Verónica Torres, Rocío López y Esther Díaz por su laborioso trabajo en el procesamiento del ARN tumoral y la Dra. Teresa Gómez del Centro Nacional de Biotecnología por su ayuda en los experimentos *in vitro* sin los cuales este trabajo no respondería a muchas preguntas.

Al Prof. Stan Kaye y mis compañeros del Hospital Royal Marsden en Londres por haberme acogido como uno más y enseñarme las bases del desarrollo de fármacos para que nuestro esfuerzo investigador pueda convertirse algún día en una terapia que ayude a los pacientes. Gracias a ellos esta tesis puede ser avalada en Europa.

A los Dres. Santiago Coca y Santos Enrech con los que descubrí la investigación en oncología cuando era un estudiante de medicina en el Hospital Gómez Ulla.

A los enfermos por quienes todo esto tiene sentido.

A mi padre, por ser el origen de mi interés por la ciencia. Por ayudarme y enseñarme que el conocimiento es la única inversión que siempre es rentable

A mi madre, por darme todo sin pedir nada a cambio.

A mi hermana Rocío, por su apoyo incondicional, y a mi hermano César, por demostrar que nunca se debe dejar de perseguir un sueño.

A mis amigos, en especial, Álex y Boris, por haber sido un estímulo constante para pensar más allá de la medicina.

Y por último, mi agradecimiento a mi mujer, Sonsoles, por estar a mi lado, apoyarme, y ser la causa de mi felicidad.

A todos, gracias.

# RESUMEN/SUMMARY

---





---

## SUMMARY

---

**Introduction:** Colorectal carcinoma is one of the leading causes of cancer mortality worldwide, and rectal cancer accounts for 30-35% of these cases. Preoperative chemoradiotherapy (CRT) followed by total mesorectal excision is the current standard of treatment for stages II and III. It improves local control and reduces toxicity and possibly improves disease free survival (DFS) compared with postoperative treatment. However about one third of patients still develop distant metastases and eventually die of the disease. For this reason, current research is focused on prognostic factors to better identify these patients. To date, pathologic TNM stage and circumferential resection margin status are the most important prognostic factors, but changes due to preoperative treatment have to be considered. Tumor regression grade (TRG) as described by Dworak, is assessed by the degree of residual tumor and stromal changes at the site of previous tumor and has been correlated with prognosis. Despite the advances in the knowledge of the multistep process of specific genetic changes that drive the transformation from normal colonic epithelium to an invasive cancer, only KRAS status is currently used in clinical practice for treatment selection in the metastatic setting. The identification of therapeutic targets is crucial to develop alternative strategies to the management of this disease and rectal cancer represents an ideal model for the study of molecular pathogenesis due to the accessibility of tissue for biopsy.

In this study we sought to characterize the differential expression by qPCR of selected genes

before and after CRT for rectal cancer with the aim to identify potential mechanisms of resistance and therapeutic targets.

**Material and Methods:** This is a retrospective cohort study including 129 consecutive patients. Quantitative PCR of 53 candidate genes was performed on the biopsy before treatment and on the surgical specimen after CRT. A paired-samples t-test was performed to determine genes significantly changed after CRT. The result was correlated with patients' disease-free survival (DFS).

**Results:** 22 genes were significantly upregulated and 2 were significantly downregulated. Several of the upregulated genes have roles in cell cycle control; these include CCNB1IP1, RCC1, EEF2, CDKN1, TFF3 and BCL-2. The upregulation of TFF3 was associated with a worse DFS in multivariate analyses (HR=2.64; p=0.027). Patients whose surgical specimens immunohistochemically showed secretion of TFF3 into the lumen of the tumoral microglands had a higher risk of relapse (HR=2.51; p=0.014). In vitro experiments showed that DLD-1 cells stably transfected with TFF3 were significantly less sensitive to 5-fluorouracil and showed upregulation of genes involved in the transcriptional machinery and in resistance to apoptosis.

**Conclusion:** Upregulation of TFF3 after CRT for RC is associated with a higher risk of relapse. The physiological role of TFF3 to restore the mucosa during CRT could be interfering with treatment efficacy. Our results could reveal not only a novel RC prognostic marker but also a therapeutic



# INTRODUCCIÓN

---



---

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Las enfermedades neoplásicas suponen uno de los problemas de salud más importantes del siglo XXI. Según la Organización Mundial de la Salud, durante el año 2008, 7,6 millones de personas en el mundo murieron de algún tipo de cáncer (13% de todas las muertes)(1). Se calcula que para el año 2030 esta cifra se incrementa hasta los 13,1 millones de personas. Esto es debido al envejecimiento progresivo de la población mundial así como a la disminución de los fallecimientos por enfermedades infecciosas. A pesar de la creencia habitual de que este tipo de enfermedades son exclusivas de países con alto índice de desarrollo, el 70% de las muertes por cáncer suceden en países con baja/media renta *per cápita* (2). No solo el impacto humano por mortalidad y sufrimiento hace que estas enfermedades tengan una elevada trascendencia en la sociedad actual, el elevado coste de muchos tratamientos antineoplásicos suponen un consumo de recursos alto y en muchos lugares del mundo inaccesible para la mayoría de la población. Se estima que sólo en Estados Unidos en el año 2020 se gastarán 157.000 millones de dólares (en dólares de 2010) en el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades (3). Desafortunadamente, la elevada trascendencia de estas enfermedades y su progresivo aumento en incidencia no ha ido acompañado de una mayor inversión en investigación y desarrollo (I+D) que supone el 2% del producto interior bruto (PIB) mundial y del 1,35 del PIB español en 2010, cifra que no se ha modificado significativamente durante los últimos 10 años (4). Recae, por tanto, una elevada responsabilidad en los investigadores que a pesar del incremento de los costes de investigación y el estancamiento en la inversión, deben responder ante una sociedad que demanda avances científicos

aplicables. La rigurosidad científica adquiere por lo tanto una elevada importancia en el paradigma actual. Es en este contexto, durante las últimas dos décadas, donde surge la *oncología traslacional*. La amplia brecha que existía entre la investigación básica y la investigación clínica se estrecha de esta manera, trasladando de forma inmediata los descubrimientos básicos a la investigación clínica sobre pacientes.

El adenocarcinoma colorrectal representa uno de los mayores retos de la investigación en oncología. Es el tercer tumor más frecuente en ambos géneros tanto en frecuencia como en mortalidad y aunque tradicionalmente los tumores del colon y el recto eran considerados globalmente como una única entidad, presentan en la actualidad diferencias importantes tanto en el tratamiento de la enfermedad precoz como la localmente avanzada. El cáncer de recto representa un tercio de todos los tumores del intestino grueso y supone una excelente oportunidad como objeto de investigación dada su accesibilidad para la toma de muestras.

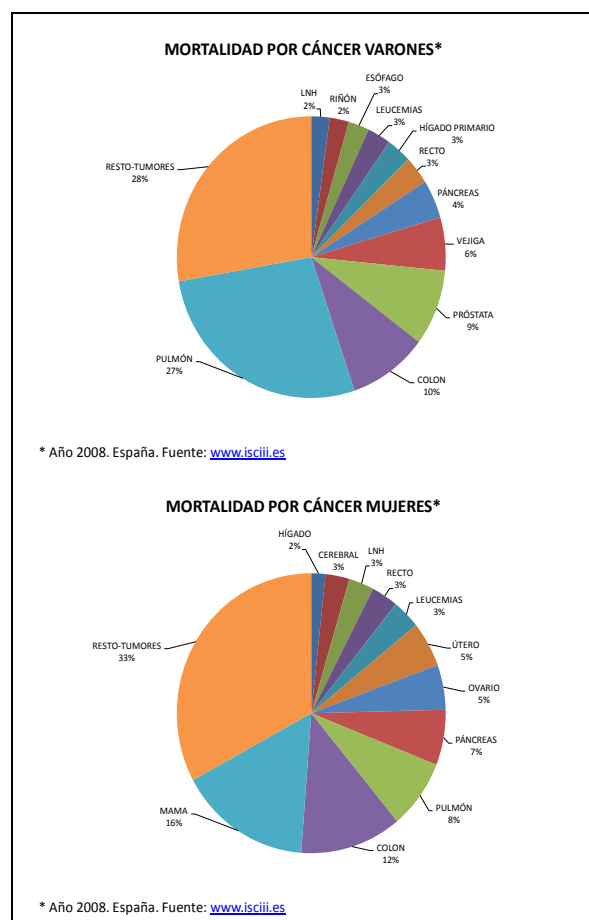
En un trabajo previo, realizado por nuestro grupo, se determinó la correlación entre la expresión génica tumoral y la respuesta al tratamiento neoadyuvante del cáncer de recto. Se obtuvo, de esta manera, un perfil de expresión de 13 genes de la biopsia diagnóstica que se correlacionaba tanto con la respuesta al tratamiento como con la supervivencia (5) (Sección 7.1). En el presente trabajo de investigación hemos planteado la hipótesis de que el tratamiento con quimio-radioterapia sobre el cáncer de recto modificaría la expresión génica de las células tumorales. Con esto, cabe pensar que algunas de estas modificaciones surjan como mecanismos de resistencia al tratamiento por lo que, correlacionándolo con la evolución clínica de los

pacientes se pueda encontrar algún gen con significado pronóstico cuyo producto proteico final pueda ser una diana terapéutica.

## 1.1.Epidemiología

El cáncer colo-rectal (CCR) supone la tercera causa de muerte en ambos géneros, lo cual representa aproximadamente un 10% del total de los fallecimientos por cáncer (Figura 1). A pesar de los avances tanto en el diagnóstico como en el tratamiento, la mortalidad en España del cáncer de colon ha presentado un aumento progresivo desde los años 80, mientras que la mortalidad por cáncer de recto se ha mantenido estable (Figura 2).

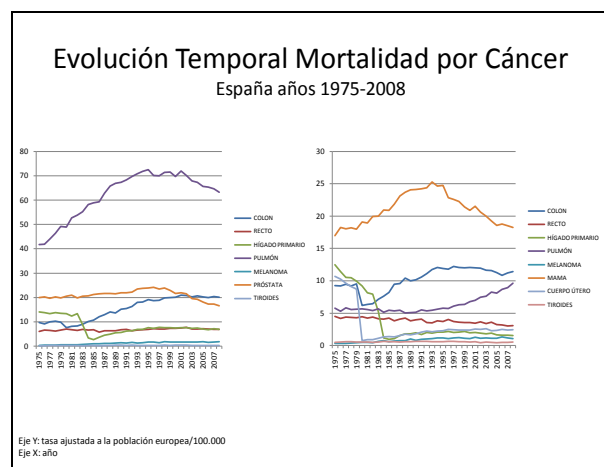
Figura 1 Mortalidad por cáncer en España



La asociación del CCR con factores ambientales ha sido ampliamente estudiada mediante estudios epidemiológicos. La mayoría de estudios apuntan a

la obesidad como factor de riesgo de CCR. El aumento del índice de masa corporal (IMC) se asocia a tumores de colon derecho (6-8). El estudio prospectivo de Framingham apunta que la circunferencia de la cintura y el ratio cintura-cadera son más informativos que el IMC para determinar el riesgo de padecer cáncer de colon (9). En este estudio, adultos varones con mayor circunferencia de cadera tenían un riesgo relativo de CCR de 4,4. Los estudios realizados en mujeres han sido menos consistentes con resultados que demuestran poca asociación directa con el IMC y una clara influencia del estatus menopáusico (10). Parece que el IMC tiene influencia en el riesgo de CCR en mujeres pre-menopáusicas mientras que en las post-menopáusicas apenas tiene influencia, presentando estas últimas un menor riesgo independientemente de su IMC. Por este motivo se ha postulado un posible papel protector del CCR con la terapia hormonal sustitutiva (THS) (11). En un amplio estudio caso-control se observó que las mujeres que habían utilizado alguna vez THS tenían un menor riesgo de cáncer de colon [Odds Ratio (OR): 0,82] con riesgo aún menor si el uso era reciente (OR: 0,71) (12). El mayor estudio prospectivo se realizó con 16.608 mujeres post-menopáusicas que fueron aleatorizadas a una combinación de estrógeno y progestágeno o placebo. La reducción del riesgo de CCR en el grupo con THS fue del 44% (OR: 0.56) con respecto al grupo placebo (13).

Figura 2. Evolución temporal de la mortalidad por cáncer



Existe también una relación de la actividad física con el riesgo de cáncer de colon pero, curiosamente, no con el cáncer de recto. Los resultados son consistentes incluso ajustando por el IMC, de forma que los sujetos con mayor riesgo de CCR son los físicamente inactivos con elevado IMC, presentando un OR de 3,35 (14). La dieta en sí misma es uno de los factores más importantes que condicionan el riesgo de padecer CCR siendo responsable en parte de las variaciones geográficas en cuanto a incidencia de estos tumores. Sin embargo, realizar estudios epidemiológicos que sean capaces de aclarar qué tipo de alimentación es la responsable del aumento de riesgo de CCR es complicado debido a los múltiples factores de confusión. Por este motivo los resultados de estos estudios son cuanto menos controvertidos. Parece claro, no obstante, que una elevada ingesta calórica conlleva un incremento del riesgo de CCR independientemente de si el incremento energético proviene de grasa, proteínas o carbohidratos (15). Lo que parece claro es que las tasas de CCR están geográficamente correlacionadas con la ingesta *per cápita* de grasa animal y carne. En Japón, tras la II guerra mundial se produjo un aumento de la incidencia de CCR aproximadamente dos décadas después, coincidiendo con una occidentalización de la dieta, incrementándose el consumo de carne y grasas de origen animal (16). Uno de los mayores estudios epidemiológicos realizados en EEUU sobre 148.610 adultos obtuvo un

incremento del riesgo de cáncer de colon del 50% en aquellos sujetos con elevada ingesta de carne roja comparado con aquellos con mayor ingesta de aves/pescado (riesgo relativo (RR): 1,5). Este efecto era incluso mayor para el cáncer de recto con un RR de 1.71 (17).

Otros nutrientes esenciales han demostrado tener importancia en el riesgo de padecer CCR. El folato es una vitamina B hidrosoluble que participa como coenzima transportadora de fragmentos monocarbonados mediante reducción del ácido fólico a dihidrofólico ( $FH_2$ ), y éste a tetrahidrofólico ( $FH_4$ ). Niveles bajos en sangre de ácido fólico se correlacionan de forma directa con mayor riesgo de CCR. Un meta-análisis de 7 estudios de cohortes y 9 estudios caso-control, mostraba una reducción del 25% del riesgo entre los sujetos con mayores niveles de folato en sangre (18). Por este motivo, desde 1996 los cereales son enriquecidos en ácido fólico en los EEUU. A pesar de esta medida, un estudio demostró que las personas con bajos niveles de folato en sangre presentaban un riesgo aumentado de CCR, que tan solo se normalizaba en aquéllos que tomaban suplementos vitamínicos que contenían ácido fólico. No hubo efecto protector en aquéllos con niveles normales de fólico en sangre (19). Las razones por la que el fólico muestra un efecto protector (o más correctamente, perjudicial en su ausencia), son desconocidas. Posiblemente tengan relación con la importancia de esta co-enzima en el metabolismo celular y la reparación del DNA. El déficit de fólico, por tanto, puede ser causa de un incremento en la tasa de mutaciones espontáneas (20) con el subsecuente aumento en el riesgo de presentar una neoplasia. Recientes estudios de polimorfismos en genes implicados en el metabolismo del folato, están clarificando la importancia de esta molécula en la patogénesis del CCR. La enzima metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es la limitante en la producción de la forma de folato que aporta el grupo metilo para la síntesis de metionina. La sustitución de citosina (C) por tiamina (T) en la posición 677 produce una baja actividad de esta enzima. Los individuos con

genotipo *TT* presentan unos niveles significativamente bajos de folato en sangre comparados con los de genotipo nativo (*CC*). Diversos estudios han demostrado que aquéllos sujetos con genotipo *MTHFR TT* y baja ingesta de folatos presentan mayor riesgo de CCR (21-25).

La vitamina D también ha sido propuesta como posible factor quimio-preventivo del CCR. Estudios de distribución geográfica muestran una interesante asociación del CCR con aquellas áreas donde existe una mayor incidencia de raquitismo (26). También se ha observado una mayor incidencia de CCR en zonas norestes de EEUU comparadas con zonas del sur donde una mayor exposición a luz ultravioleta facilita la síntesis endógena de vitamina D. Estudios prospectivos han demostrado una asociación directa entre niveles bajos de vitamina D en sangre y riesgo de desarrollar tanto adenomas (27) como CCR (28).

Otros nutrientes como el selenio (29) o el calcio (30) también han sido propuestos como factores a tener en cuenta a la hora de analizar el riesgo de padecer un CCR aunque los resultados son, hasta la fecha, menos concluyentes.

Existe una gran cantidad de evidencia científica que avala el efecto protector de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) e inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) sobre el desarrollo del CCR. La evidencia de la asociación inversa entre el uso de estos fármacos (como aspirina, ibuprofeno, indometacina o piroxicam) ha sido demostrada en estudios epidemiológicos (31-34), animales (35-38) y de intervención en personas con poliposis adenomatosa familiar (39-41). Los resultados muestran una reducción aproximada del 50% del riesgo de CCR con el consumo de este tipo de fármacos. La mayor evidencia proviene de un ensayo clínico aleatorizado doble-ciego realizado por Baron (42). Los resultados de este trabajo muestran una reducción del riesgo de adenoma colo-rectal en aquellos aleatorizados a tomar 81 mg al día de aspirina comparado con placebo,

aunque no hubo diferencias con los que recibían dosis mayores (325 mg al día). Sin embargo los resultados perniciosos de los inhibidores de COX-2 sobre el riesgo cardiovascular han hecho que la toma de este tipo de medicamentos a largo plazo como prevención primaria del CCR sea desaconsejada en la actualidad.

Hasta el 5% de los casos de adenocarcinoma colo-rectal pueden ser hereditarios (43). La causa más frecuente es el síndrome de Lynch el cual, se produce por una mutación germinal de algún gen reparador del DNA de la familia de *mismatch repair (MMR)*: *MLH1*, *MLH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EpCAM*. Los individuos con este tipo de alteración presentan un riesgo de cáncer colo-rectal de 50-80% a lo largo de su vida y presentan tumores característicos con inestabilidad de microsatélites (pacientes jóvenes lesión en colon derecho) (44).

La poliposis adenomatosa familiar (PAF) es la segunda causa de cáncer de colon hereditario después del S. de Lynch. Tiene una prevalencia de 1 por cada 10.000 habitantes. Se produce por mutación en línea germinal del gen *APC* y en función del locus afecto la enfermedad tiene distinta penetrancia con formas de PAF atenuada (se encuentran 10-100 pólipos) a la PAF clásica en la que se encuentran más de 100 pólipos en edades tempranas. Otra variante de la PAF es la poliposis asociada a *MUTYH*. En este trastorno se produce la mutación bialélica del gen *MUTYH*, que codifica una proteína implicada en el mecanismo de reparación del DNA por escisión de bases(45). Los individuos con inactivación de este gen presentan pólipos en número similar a la PAF atenuada. Los pólipos en la PAF son adenomatosos mientras que en la poliposis asociada a *MUTYH* pueden ser hiperplásicos (46, 47).

Existen otras formas de cáncer colo-rectal familiar aún menos frecuentes como las poliposis hamartomatosas, entre los que se encuentran el síndrome de Peutz-Jeghers causado por mutación de *STK11*, la poliposis juvenil (mutación de



SMAD4 y BMRP1A) o el síndrome de Cowden por mutación en PTEN (48, 49).

A pesar de los avances en el conocimiento de las mutaciones germinales que producen los síndromes familiares de cáncer colo-rectal en otro 20% aproximadamente existe una clara agregación familiar sin causa genética identificable. Las personas que cumplen criterios clínicos de síndrome de Lynch (Amsterdam o Bethesda) y no se identifica alteración de genes MMR se caracterizan como cáncer colorrectal familiar tipo-X y pueden representar hasta el 2% de los casos (50). En el resto, no se cumplen estos criterios pero se observa un incremento del riesgo. Se ha observado un aumento del riesgo de 2 a 3 veces en personas con un familiar de primer grado diagnosticado de cáncer de colon con edad superior a 50 años. Esto sugiere que existen otras formas de cáncer colo-rectal "hereditario" que provienen de polimorfismos en genes de susceptibilidad con baja penetrancia que están siendo estudiados en profundidad (51).

## 1.2. Historia natural

El 98% de los tumores que asientan en el intestino grueso son adenocarcinomas. El resto de variedades histológicas son extremadamente infrecuentes e incluyen linfomas, melanomas y tumores de origen mesenquimal como tumores carcinoides, leiomiomas, liposarcomas y sarcomas de Kaposi.

La distribución de los cánceres en el colon y el recto es la siguiente: ciego y colon ascendente 38%; colon transverso 18%; colon descendente 8%; recto-sigma: 35%. El 99% de los carcinomas son únicos, pero cuando existen tumores sincrónicos tienden a aparecer en regiones muy separadas del colon.

No existe una definición anatómica uniformemente aceptada para el recto. Con frecuencia se considera que comienza en los últimos 15 cm. del intestino grueso, que es donde suelen detectarse cambios en la musculatura de la pared y donde empieza a

convertirse en un órgano retroperitoneal. Sin embargo, a la hora de planificar la estrategia terapéutica de los tumores que asientan en esta zona, se entiende por recto a la zona de intestino grueso localizada por debajo del repliegue peritoneal, lo que se sitúa en los últimos 12-15 cm dependiendo de las personas. Distalmente el recto termina en la línea pectínea, a 1-2 cm. por debajo del anillo anorrectal donde comienza el epitelio queratinizado del ano. El recto puede dividirse en tres partes en función de la localización de las válvulas de Houston: tercio inferior, situado entre 3 y 5 cm. del margen anal, tercio medio de 5 a 10 cm. y tercio superior, de 10 a 15 cm. No obstante, cabe tener en cuenta que existe una cierta variabilidad interpersonal en la localización de estas válvulas, que puede oscilar entre 1 y 2 cm.

Los pacientes con CCR permanecen asintomáticos durante años y representan un importante reto diagnóstico, ya que se piensa que todos provienen de un pólipo previo. El riesgo de malignidad de los pólipos es proporcional a tres características independientes: el tamaño (a mayor tamaño, mayor probabilidad), su arquitectura histológica (los vellosos mayor probabilidad sobre los tubulares) y la magnitud de la displasia.

Una vez que el carcinoma alcanza la submucosa y se convierte en infiltrante, se propaga por extensión directa hacia estructuras adyacentes y por metástasis a ganglios linfáticos regionales, el hígado, los pulmones y los huesos, por orden de frecuencia. El cáncer rectal tiene la peculiaridad de encontrarse en una zona exenta de serosa, por lo que la invasión de estructuras vecinas es más probable.

La estadificación actual se hace de acuerdo con la clasificación TNM versión 7 reflejada en las Tabla 1 (52, 53)

**Tabla 1. Clasificación TNM de la American Joint Committee on Cancer**

Clasificación	Definición
<b>T</b>	
<b>1</b>	Invasión la submucosa
<b>2</b>	Invasión de la muscular propia
<b>3</b>	Traspasa la muscular propia hacia los tejidos peri-colorrectales
<b>4</b>	A: penetra a la superficie del peritoneo visceral B: invade o está adherido a otros órganos o estructuras
<b>N</b>	
<b>1</b>	Metástasis de 1 a 3 ganglios linfáticos. A: en 1 ganglio B: en 2 ó 3 ganglios C: depósitos en tejido peri-rectal no peritonealizado.
<b>2</b>	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos. A: de 4 a 6 ganglios. B: en 7 o más ganglios.
<b>M</b>	
<b>1</b>	Metástasis a distancia A: metástasis en un único órgano B: metástasis en varios órganos o en peritoneo.
<b>Estadio</b>	
<b>I</b>	T1-T2 N0 M0
<b>IIA</b>	T3N0M0
<b>IIB</b>	T4aN0M0
<b>IIC</b>	T4bN0M0
<b>IIIA</b>	T1-T2 N1 M0 T1 N2a M0
<b>IIIB</b>	T3-T4a M0 T2-T3 N2a M0 T1-T2 N2b M0
<b>IIIC</b>	T4a N2a M0 T3-T4a N2b M0 T4b N1-N2 M0
<b>IVA</b>	M1a
<b>IVB</b>	M1b

La estadificación correcta, por lo tanto, sólo puede hacerse una vez extirpado el tumor. Sin embargo, el tratamiento actual del cáncer de recto tiene la peculiaridad de que en ocasiones requiere un tratamiento neoadyuvante con quimioterapia sistémica y radioterapia local que modifican las características histopatológicas del tumor. Por este motivo, en la actualidad, al estadio TNM del tumor se le añade una "c" (*clínica*) si ha sido determinada

mediante pruebas diagnósticas y posteriormente tras su extirpación, se la añade una "p" (*pathologic*). En caso de haber recibido tratamiento neoadyuvante se le añade una "y" (*yatrogenic*) para su correcta interpretación.

### 1.3. Biología molecular

El CCR se desarrolla como resultado de la progresiva acumulación de alteraciones tanto genéticas como epigenéticas que producen la transformación del epitelio colo-rectal normal en el adenocarcinoma. Este proceso ha sido denominado secuencia pólipo-carcinoma y fue elegantemente propuesta por Fearon y Vogelstein en los 90 (54). Durante los últimos 20 años ha ido aumentando el conocimiento global de este proceso y gracias a las técnicas de alto rendimiento se ha podido obtener lo que se denomina el "paisaje" genómico del CCR (55).

Las alteraciones genéticas y epigenéticas que conllevan la transformación del epitelio colónico normal en adenomas y éstos en carcinomas producen una expansión clonal en los focos de criptas aberrantes.

En estos, se produce una alteración en la zona de proliferación (el fondo de la cripta), extendiéndose de esta manera hasta la superficie sin que haya un incremento de la apoptosis celular que compense la hiperproliferación con la consecuente formación de un pólipo (56, 57). Diversos estudios han demostrado que la proliferación hiperplásica en los focos de criptas aberrantes es monoclonal (58) y una elevada frecuencia contienen rasgos displásicos con inestabilidad genética (59).

Como puede verse en la Figura 3, existen tres vías principales de carcinogénesis: inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites e hipermetilación. Desde un tipo de vista conceptual estos mecanismos se han agrupado en tres tipos moleculares de CCR:

a) *Fenotipo Supresor*: se produce por silenciamiento de genes supresores de tumores. La

carcinogénesis es por inestabilidad cromosómica (CIN). Supone el 80% de los CCR esporádicos y aquellos casos hereditarios por mutaciones en APC (poliposis adenomatosa familiar) (60). Otros genes implicados en este tipo de tumorigénesis son *ATM*, *ATR*, *BRCA1*, *BRCA2*, *STK15* y *CDC4* (61-64)

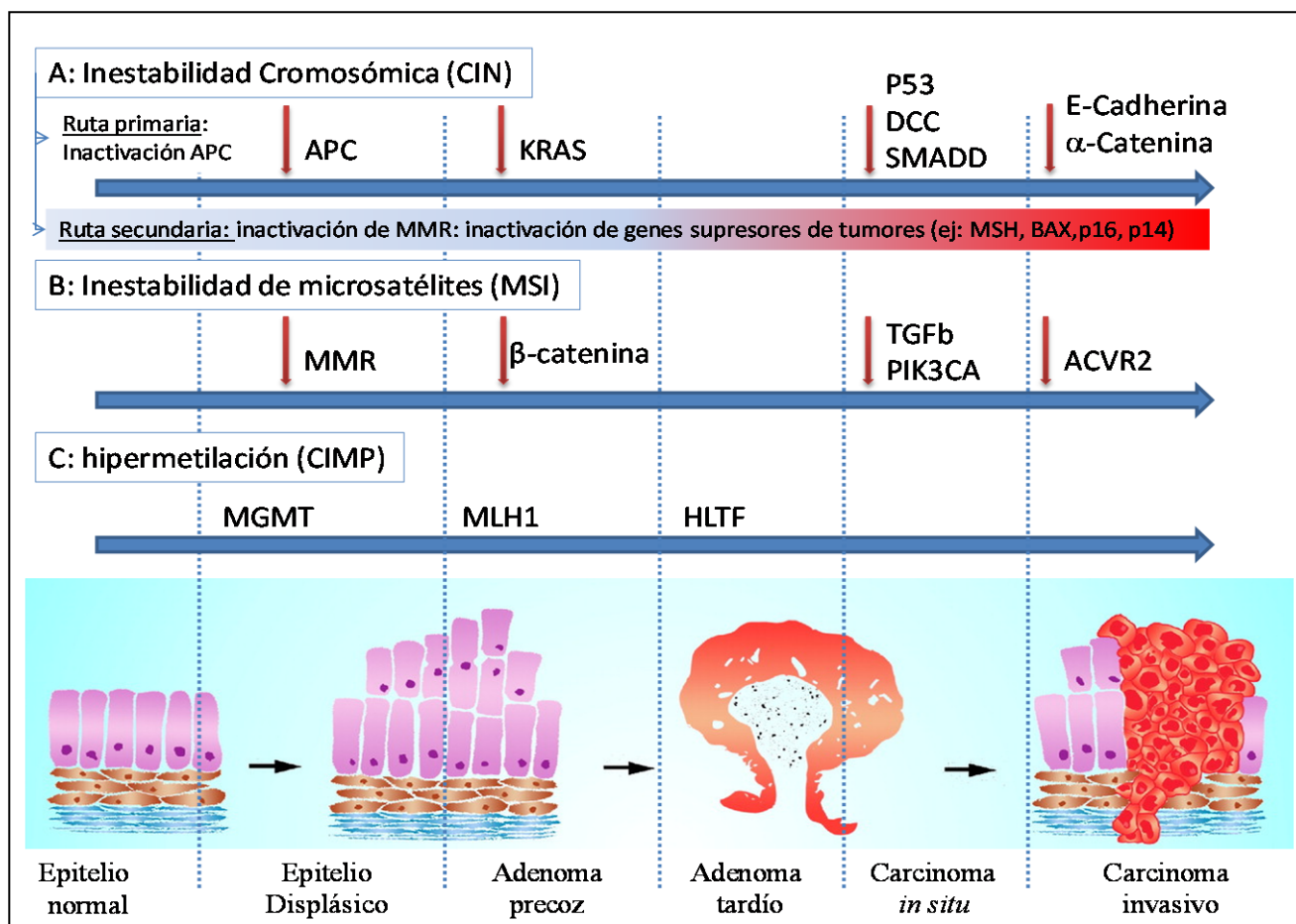
b) *Fenotipo mutador*: supone los casos con inestabilidad de microsatélites (MSI), en torno al 20% de los casos de CCR esporádico y los casos hereditarios de cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC) con mutaciones en genes de reparación del DNA (*Mismatch Repair System*: MMR) (65). Estos tumores presentan características clínicas típicas como son la mayor incidencia de tumores en colon derecho, aparecen en pacientes más jóvenes y es frecuente su asociación con la ausencia de respuesta a la quimioterapia por mecanismos aún no dilucidados (66-68)

c) *Fenotipo metilador*: (*CpG Island Methylation Phenotype*: CIMP). Se produce por silenciamiento de genes como *MLH1*, *p16*, *MINT1*, *MINT2* o *MINT3*, mediante metilación de las islas CpG (Citosina-Guanina) en las regiones promotoras con la consecuente inhibición de la expresión génica. Se ha observado que el 80% de los tumores con MSI tienen una metilación aberrante de *MLH1* (69, 70). Otros genes frecuentemente silenciados de esta manera son *CDKN2A/p16*, *MGMT*, *p14/ARF* y *HLTF* (71-74). Estos tumores globalmente suelen presentar metilación aberrante global del genoma por lo que se han considerado una vía carcinogénica del CCR independiente de las dos anteriores aunque frecuentemente estas coexistan.

### 1.3.1. Alteraciones genéticas específicas.

Se habla de dos tipos principales de genes

Figura 3. Vías de carcinogénesis colo-rectal.



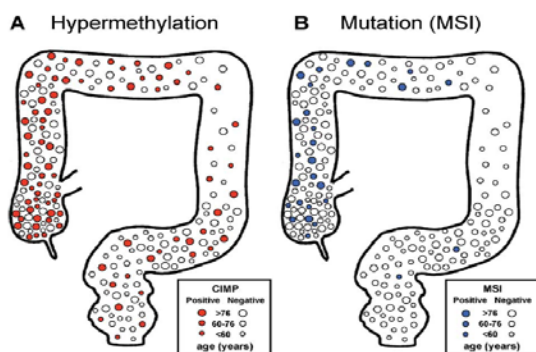
involucrados en el desarrollo del cáncer: los *gatekeepers*, responsables de inhibir la proliferación e iniciar la apoptosis en el momento indicado y los *caretakers*, responsables de mantener la estabilidad genética de las células(75). Las rutas de carcinogénesis del CCR conllevan por lo tanto mutaciones en distintos genes que definirán ante que subtipo de neoplasia nos encontramos.

Aunque histológicamente los tumores de colon y recto son indistinguibles, estudios recientes sugieren que biológicamente pueden no ser tan similares, principalmente entre "colon derecho" y colon izquierdo" (Tabla 2 - página siguiente) (76). Las tasas de mutaciones varían según la localización y por tanto los subtipos moleculares encontrados son más o menos frecuentes según la localización del tumor (Figura 4 tomada de ref (77).

Tabla 2

	Proximal	Distal	Rectal
<b>P53<sub>mut</sub></b>	40%	51%	46%
<b>MLH1<sub>mut</sub></b>	17%	3%	1%
<b>CIMP<sup>+</sup></b>	41%	13%	12%
<b>MSI<sup>+</sup></b>	24%	4%	2%

Figura 4. Distribución en el colon de los fenotipos.



## APC

El papel de las alteraciones genéticas del CCR fue sugerido inicialmente por el síndrome de poliposis adenomatosa familiar (FAP). El gen responsable de este síndrome es APC. Este gen se encuentra mutado en el 70% de los casos esporádicos, y forma parte de la vía de señalización *wingless* (Wnt)/b-catenina que globalmente se encuentra alterada en algún punto en el 100% de los CCR. Este gen contiene 15 exones que codifican una proteína de 310 Kilodaltons (kDa) y posee múltiples dominios funcionales que median la oligomerización y unión a multitud de proteínas intracelulares como  $\beta$ -catenina,  $\gamma$ -catenina, kinasa glicogeno sintasa (GSK)-3 $\beta$ , axina, tubulina, EBP-1 (78) (Figura 5).

Las mutaciones de APC pueden afectar a los dominios de interacción con  $\beta$ -catenina (residuos 1020-1169) o a los dominios de interacción con Axina (residuos 1324-2075) (79-81). Más del 90% de las mutaciones producen codones de stop anormales que resultan en una proteína truncada (82). Frecuentemente estas mutaciones se asocian a delección cromosómica en el alelo normal, aunque la inactivación bialélica también puede ocurrir por una segunda mutación o hipermetilación (83, 84).

Figura 5. Vía de Señalización WNT/APC

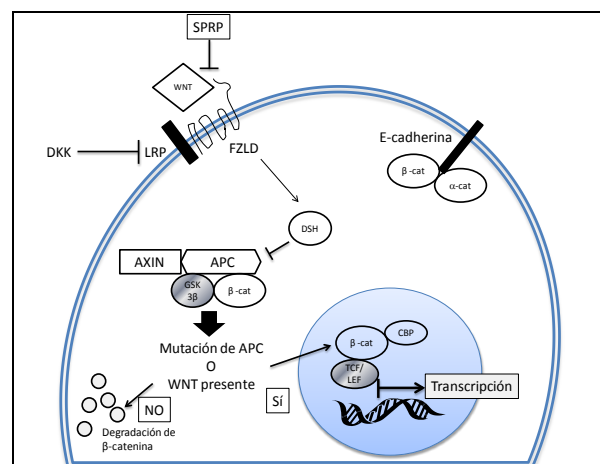


Tabla 3. Genes frecuentemente alterados en el adenocarcinoma colo-rectal.

Gen	Vía alterada	Alteración	Frecuencia de alteración en CCR	Mutación germinal	Comentarios
<i>APC</i>	Wnt	Mutación	70%	Sí	
<i>CTNNB1</i>	Wnt	Mutación	2%	No	Más frec. en MSI
<i>AXIN2</i>	Wnt	Mutación	Rara	Sí	
<i>SFRP1</i>	Wnt	Metilación	90%	No	
<i>SFRP2</i>	Wnt	Metilación	85%	No	
<i>KRAS</i>	Ras-Raf	Mutación	40%	No	
<i>BRAF</i>	Ras-Raf	Mutación	30% (MSI)	No	
<i>PIK3CA</i>	PI3K	Mutación	30%	No	
<i>PIK3R1</i>	PI3K	Mutación	5%	No	
<i>PTEN</i>	PI3K	Mutación	Rara	Sí	Mutación germinal causa el S. de Cowden
<i>TP53</i>	Ciclo celular	Mutación	>50%	Sí	Mutación germinal causa el S. de Li Fraumeni
<i>P14ARF</i>	Ciclo celular	Metilación	20%	No	
<i>TGFBR2</i>	TGF- $\beta$	Mutación	30%	Sí	Más frecuentes en MSI
<i>TGFBR1</i>	TGF- $\beta$	Polimorfismo	Rara	Sí	TGFBR1*6A polimorfismo asociado con más riesgo de CCR
<i>SMAD4</i>	TGF- $\beta$	Mutación	16%	Sí	Mutación germinal poliposis juvenil
<i>SMAD2</i>	TGF- $\beta$	Mutación	2%	No	
<i>ACVR2</i>	TGF- $\beta$	Mutación	60-90% MSI	No	Más frecuentes en MSI
<i>BMPRI1A</i>	Vía BMP	Mutación		Sí	
<i>MYH</i>	BER	Mutación	Rara	Sí	
<i>MLH1</i>	MMR	Metilación	10% de esporádicos	Sí	Causa más frecuente de cancer hereditario no polipósico (HNPCC)
<i>MSH2</i>	MMR	Mutación	Rara	Sí	HNPCC
<i>MSH6</i>	MMR	Mutación	Rara	Sí	HNPCC
<i>PMS2</i>	MMR	Mutación	Rara	Sí	HNPCC

BER: Base excision repair. MMR: mismatch excision repair.

Una de las causas por las que estas mutaciones resultan oncogénicas, es por sobre-activación de la vía de señalización Wnt que conlleva la transcripción excesiva de genes implicados en el crecimiento celular como MYC o MMP7 (85, 86). En situaciones normales, la proteína GSK-3 $\beta$  forma un complejo con APC,  $\beta$ -catenina y axina, lo cual provoca la fosforilación de estas y la subsecuente degradación de  $\beta$ -catenina por el proteosoma. Tanto la estimulación de *frizzled* (FZLD) por la proteína WNT como la mutación de APC evita este proceso, produciéndose una acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina que se trasladará al núcleo con mayor frecuencia.

Además de la función de APC como regulador de la vía Wnt de señalización, presenta funciones reguladoras de las adhesiones adherentes intercelulares mediante  $\beta$ -catenina que supone el nexo de unión entre E-cadherina y  $\alpha$ -catenina, con la consecuente implicación de este gen en la transición epitelio-mesénquima y la capacidad invasiva celular (87).

### $\beta$ -catenina

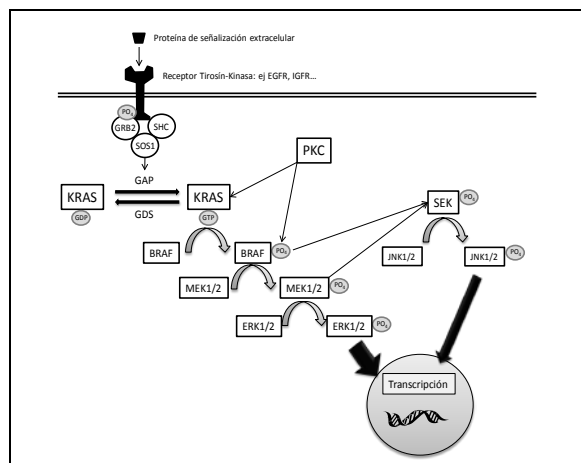
El gen que codifica  $\beta$ -catenina es *CTNNB1* y se encuentra mutado en el CCR en aproximadamente el 2% de los casos (88). Las mutaciones en este gen conllevan la resistencia de la proteína a la degradación por el

proteosoma (89, 90) y también pueden provocar una falta de unión a E-cadherina provocando una disminución de la adhesión intercelular (91, 92).

### KRAS

El gen Ras pertenece a una de las primeras familias de oncogenes conocidos cuyos miembros se denominan H-, K- y N-Ras. Los productos finales son unas proteínas llamadas Ras GTPasas. Transducen señales desde la membrana celular hasta el núcleo (Figura 6). Sus principales funciones, en condiciones normales, cuando el oncogén no está activado, son múltiples y centrales para el correcto funcionamiento de la célula. Incluyen el control de la proliferación y diferenciación, de la apoptosis, del metabolismo lipídico y de la citoarquitectura. La GTPasa está activa cuando está ligada a GTP e inactiva cuando éste está desfosforilada (GDP), en un equilibrio que se mantiene gracias a los reguladores GAP (*GTPase Activating Protein*) y GDS (*GDP Dissociation Stimulator*). Las mutaciones del oncogén Ras, uno de los primeros conocidos, se han visto en ambas rutas de carcinogénesis de CCR.

Figura 6. Vía de señalización de KRAS



La proteína codificada por *KRAS* tiene tres dominios: uno para la unión con GTP o GDP, otro para anclarse a la membrana celular y otro para interactuar con otras proteínas

citoplasmáticas. Las mutaciones oncogénicas en *KRAS* afectan a la actividad GTPasa por lo que la proteína puede permanecer constitutivamente activada (93). Las mutaciones de *KRAS* afectan mayoritariamente al exon 2 en los codones 12, 13 y 61, siendo el primero el más frecuentemente mutado. Se producen mutaciones *missense* que provocan el cambio de aminoácido nativo (glicina) por otro: aspártico, alanina, cisteína, serina o valina (94). Globalmente, del 35% al 45% de los CCR tienen una mutación en *KRAS* (95) y aunque es un evento que, cuando sucede, lo hace de forma temprana en la carcinogénesis (aparece en los focos de criptas aberrantes), es evidente que su mutación no es condición imprescindible para la progresión de adenoma a carcinoma. Se ha observado que los tumores con mutaciones *KRAS*, mantienen una alta concordancia en la progresión metastásica y que estos tumores tienen una tendencia mayor a metastatizar en el pulmón por mecanismos biológicos que aún se desconocen (96).

Más recientemente se han descrito también mutaciones en *BRAF*, la kinasa diana de *KRAS* en la vía de señalización. Éstas se han descrito globalmente en un 11% de los CCR, aunque existe una clara diferencia entre tumores MSI que presentan una frecuencia de mutación del 27-31% y los MSS que tan sólo tienen mutado *BRAF* en el 5% de los casos (97). Interessantemente, las mutaciones de *BRAF* presentan una tendencia por aparecer en cánceres de colon (14%) sobre los cánceres de recto (4%) posiblemente por su asociación con los tumores MSI, que tienen mayor tendencia a presentarse en el "colon derecho". El 80% de las mutaciones son en el exon 15 produciéndose una sustitución de valina por glutámico (*V600E*) activándose de forma constitutiva y provocando una hiperactivación de la vía. Estas mutaciones son característicamente excluyentes de las mutaciones en *KRAS* (98). Estudios recientes utilizando *microarrays* de expresión génica han puesto de manifiesto que estos tumores poseen

una firma genética característica (99) y podrían tener un peor pronóstico (100).

### TP53

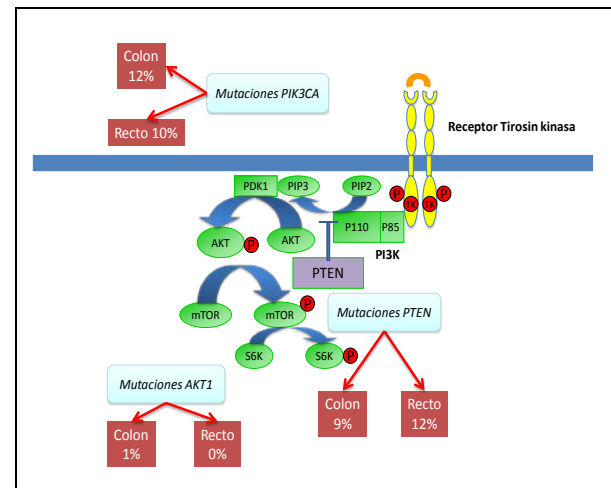
Este gen es el más frecuentemente mutado en los cánceres humanos. Codifica la proteína p53 cuya función es mantener la estabilidad genómica controlando el ciclo celular e induciendo apoptosis en respuesta al daño genotóxico (101). Contiene cuatro dominios encargados de: activación transcripcional (codones 1-43), unión al DNA (codones 100-300), dominio tetramerización (codones 324-355) y región C-terminal reguladora (codones 363-393). El espectro de mutaciones en CCR es similar al de otros tumores, presentando cuatro "puntos calientes" en la zona de unión al DNA. Al ser un gen supresor de tumores, requiere inactivación bialélica por lo que la mutación suele acompañarse de delección 17p, zona donde se encuentra el gen que codifica esta proteína (TP53). Estas mutaciones son un evento tardío no encontrándose en adenomas pero sí en los carcinomas (102, 103). La expresión normal de p53 es baja hasta que se activa en respuesta al daño genotóxico por radiación ionizante o quimioterápicos. Su activación provoca la transcripción de genes que regulan el ciclo celular y la apoptosis como p21, MDM2, FAS/APO1, CYCLIN G, etc., que detienen la replicación celular e inducen reparación del DNA (104, 105).

### PI3K

Las fosfatidil-inositol-3-kinasas (PI3K) son una familia de kinasas que regulan la proliferación celular, apoptosis y motilidad celular (106, 107). Existen múltiples isoformas que se dividen en tres clases. Las de clase I son las más frecuentemente implicadas en carcinogénesis y se componen de una subunidad catalítica (p110) y otra reguladora (p85). Esta vía de señalización es activada por receptores transmembrana con actividad tirosín kinasa como EGFR provocando

la fosforilación de fosfatidil-inositol bifosfato (PIP2) generando fosfatidil-inositol trifosfato (PIP3). La acumulación de PIP3 provoca la activación de la cascada con la consecuente fosforilación de AKT por PDK1 y ésta al *mamalian target of rapamycin* (mTOR) que activa los reguladores de la traducción 4EBP1 y S6K1. Otro de los reguladores de la vía, *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) defosforila PIP3 silenciando esta vía, y se encuentra mutado/inactivado en el 10% de los CCR aproximadamente (108). Globalmente, las alteraciones en esta vía son menores que en la vía de KRAS y la frecuencia es similar para cáncer de colon y recto (Figura 7). Las alteraciones más frecuentes de esta vía en el cáncer colorrectal se producen por mutaciones puntuales en la subunidad catalítica (PIK3CA). Existen dos regiones calientes, siendo el 80% de las mutaciones en los exones 20 (H1047R) y 8 (E542K) produciendo una hiperactivación de la vía AKT (109). Una segunda forma de alteración de esta vía es por delección de PTEN que se ha observado en hasta el 35% de los casos aunque las mutaciones de este gen son raras (2% aproximadamente) (110)

Figura 7. Vía de señalización de PI3K



### TGFβ

*Tumor growth factor beta* (TGF $\beta$ ) es una proteína de señalización extracelular que puede inducir inhibición del crecimiento celular, apoptosis y diferenciación en células epiteliales intestinales. Ejerce sus efectos intracelulares provocando la dimerización de sus receptores: TGFBR1 y TGBR2. Éstos a su vez tienen actividad serín-treonin kinasa y son capaces de fosforilar múltiples proteínas que señalizan principalmente a través de la vía SMAD aunque también puede señalizar por otras vías como la PI3K, JNK, p38MPK o RhoA, aunque no está claro si estas vías alternativas de señalización son un efecto directo o indirecto de la activación de los receptores de TGF $\beta$  (111).

De forma global se considera que la vía TGF $\beta$ /Smad se encuentra alterada en aproximadamente el 75% de las líneas celulares de CCR (112). Dado que la activación de esta vía controla la transcripción de proteínas reguladoras del ciclo celular como ciclinas D1, CDK4, p21, p27, p15, Rb (113-115), y disminuye la expresión de MYC, ésta vía debe ser suprimida en el proceso carcinogénico (116-118). El mecanismo más común por el que los CCR adquieren resistencia al TGF $\beta$  es mediante alteración génica de *TGFBR2*. La producción de proteína truncada debido a una inserción o delección de una o dos adeninas es un evento extremadamente frecuente en tumores MSI dado que este gen contiene una zona tipo microsatélite en el exon 3. Esta mutación se denomina *BAT-RII* (*bid adenine tract in TGF $\beta$  receptor type II*) y generalmente se asocia a inactivación bialélica dada la función supresora de tumores de ésta proteína (119, 120). La otra proteína que se encuentra alterada ocasionalmente en CCR es SMAD4. Su inactivación por mutación se ha descrito en el 5-16% de los CCR. Modelos murinos sugieren que su inactivación juega un papel importante en la progresión del CCR y no en la iniciación. Hasta un tercio de los pacientes con síndrome de poliposis juvenil tienen mutaciones germinales en *SMAD4* (121-124).

La pérdida de heterozigosidad de 18q ocurre en el 70% de los CCR y es en esta región donde se encuentran los genes de SMAD2, SMAD4 y DCC por lo que se ha considerado esta pérdida de heterozigosidad como causa de la alteración en la regulación de la vía de TGF $\beta$  (125).

## 1.4. Estadificación

La correcta estadificación clínica del adenocarcinoma de recto es fundamental a la hora de planificar el tratamiento adecuado ya que de ésta dependerá si el paciente será sometido a cirugía directa, quimio-radioterapia neoadyuvante o quimioterapia sola.

Las pruebas de imagen nos aportarán la información necesaria para una adecuada estadificación clínica según el TNM. El estadio definitivo será evaluado mediante la pieza quirúrgica que aportará importante información pronóstica como número de ganglios obtenidos, afectación del margen de resección circunferencial, distancia al mesorrecto, etc.

### Ecografía endorrectal

La ecografía endorrectal es una técnica útil para la estadificación local, especialmente la profundidad (T) del tumor. Un amplio estudio retrospectivo con 458 pacientes estudiados en un período de 10 años (1990-2000) mostró una alta precisión diagnóstica para los tumores T3 (86%) pero bastante baja para los tumores T4 (36%). Fue más frecuente la sobre-estadificación (19%) que la infra-estadificación (12%) (126). Otro grupo comunicó sin embargo una correcta estadificación local en el 81% de los casos, sobre una serie de 424 pacientes (127). Los estudios prospectivos han mostrado, sin embargo, un acierto algo menor, presentando el estudio más fiable hasta la fecha, realizado sobre 5.056 pacientes, un acierto del 65,8% en global, siendo algo mayor para los T3 (74.9%) y nuevamente, bastante bajo para los T4 (31%)



(128). Un meta-análisis reciente de 42 estudios (N=5039) arrojó sin embargo, resultados más alentadores con una sensibilidad y especificidad global de 80% y 95% respectivamente (129).

Uno de los mayores problemas de esta técnica es la menor capacidad de estadificar la afectación ganglionar ya que es incapaz de valorar ganglios linfáticos fuera del radio de detección del transductor, como los iliacos, mesentéricos, inguinales o retroperitoneales. Además la presencia de cambios reactivos puede conducir a una malinterpretación de ganglio metastásico cuando tan sólo presenta una reacción inflamatoria. Globalmente se considera que los ganglios metastásicos son redondeados, hipoecoicos y mayores de 5 mm de diámetro. Sin embargo, se han detectado metástasis hasta en el 18% de los ganglios menores de 5mm (130, 131) e incluso del 9,5% en aquéllos menores de 2 mm (132). Por todos estos motivos, la ecografía endorrectal tiene un acierto diagnóstico para la afectación ganglionar que varía del 64% al 75% (133-136).

### **Resonancia magnética nuclear**

La resonancia magnética nuclear (RMN) se considera la técnica de elección para la estadificación local del recto, no sólo por su alta fiabilidad para determinar el estadio, sino además porque es capaz de detectar la invasión de la fascia mesorrectal. Un reciente meta-análisis de artículos publicados entre 2000 y 2011 sobre la correlación del diagnóstico clínico mediante RMN y la muestra patológica del tumor rectal no tratado con neoadyuvancia obtuvo un acierto diagnóstico global para la T del 75%, algo menor para la N del 71% y del 94% para predecir la afectación de la fascia mesorrectal (137). Además, ensayos clínicos recientes demuestran el valor de la RMN como re-estadificación tras el tratamiento neoadyuvante previo a la cirugía. Tanto el grado de regresión tumoral por RMN (mrTRG) como la T (ymrT) tienen importancia pronóstica y

pueden ser tenidos en cuenta a la hora de planificar el tratamiento quirúrgico (138, 139).

### **Tomografía axial computerizada**

La principal utilidad de la tomografía axial computerizada (TAC) en la estadificación del cáncer de recto reside en la detección de metástasis a distancia. Su valor para evaluar la enfermedad loco-regional es mucho menor, con una fiabilidad para estadificar la T en torno al 70% y para la N del 54-70%, lo que resulta claramente inferior al de la ecografía endorrectal y la RMN de pelvis (140).

### **Tomografía por emisión de positrones**

La Tomografía por Emisión de Positrones (PET) es una técnica de imagen funcional que utiliza radioisótopos de semivida corta (de 2 a 110 minutos) asociados a trazadores. El radiofármaco más frecuentemente utilizado en cáncer de recto es la 18-fluoro-desoxiglucosa (18-FDG) que actúa como análogo de la glucosa que queda atrapado en células con alta actividad metabólica como las células del adenocarcinoma rectal. El problema es que la imagen funcional no se acompaña de correlación anatómica por eso en la actualidad se realiza conjuntamente un TAC que posteriormente se fusiona a la imagen del PET. Inicialmente se introdujo el PET/TAC como mejora al TAC solo para la identificación de metástasis a distancia. Sin embargo, cada vez se está incorporando más en el estudio de rutina de pacientes con sospecha de afectación ganglionar local, ya que puede influir en la planificación del tratamiento radioterápico. Estudios de correlación PET/TAC con histopatología, muestran unos resultados de sensibilidad y especificidad para la detección de la afectación ganglionar de 51% y 85% respectivamente (con un SUV de 1,5) (141, 142). Los resultados de estudios para la detección de metástasis hepáticas son superiores, con una sensibilidad y especificidad global

(meta-análisis de 8 estudios) del 91% y 76% respectivamente (143).

### Evaluación patológica del tumor

A pesar de todos los avances en técnicas de imagen, la estadificación final con mayor significado pronóstico es la patológica. Además del TNM, el patólogo en la actualidad debe prestar atención a distintos aspectos, especialmente si se ha administrado tratamiento neoadyuvante.

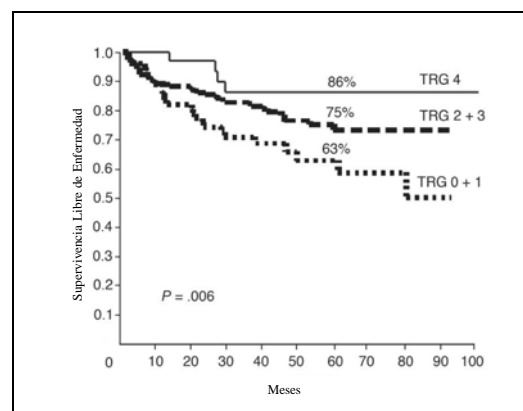
#### Grado de regresión tumoral

El grado de regresión tumoral (TRG), es la evaluación patológica de respuesta al tratamiento neoadyuvante. Fue introducido en 1998 por Dworak (144) y se consideraron las siguientes posibilidades:

- Grado 0: No aparece regresión tumoral.
- Grado 1: Masa tumoral dominante con poca fibrosis o vasculopatía
- Grado 2: Fundamentalmente cambios fibróticos con algunas células tumorales
- Grado 3: Células tumorales difíciles de encontrar con el microscopio, inmersas en tejido fibrótico, con o sin lagos de moco.
- Grado 4: No aparecen células tumorales, únicamente cambios fibróticos. Regresión completa.

Posteriormente Rödel confirmó su valor en un estudio con pacientes de ensayo clínico. Sin embargo como puede verse en la Figura 8, para tener verdadera correlación con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) los grupos 0/1 y 2/3 debían ser agrupados. Esto seguramente sea debido a la subjetividad de la valoración, ya que se definió arbitrariamente como distinción entre TRG 2 y TRG 3 la presencia de más o menos del 50% de células tumorales respectivamente (145).

**Figura 8. Supervivencia libre de enfermedad según el grado de regresión tumoral. (De ref. (145))**



#### Infraestadificación

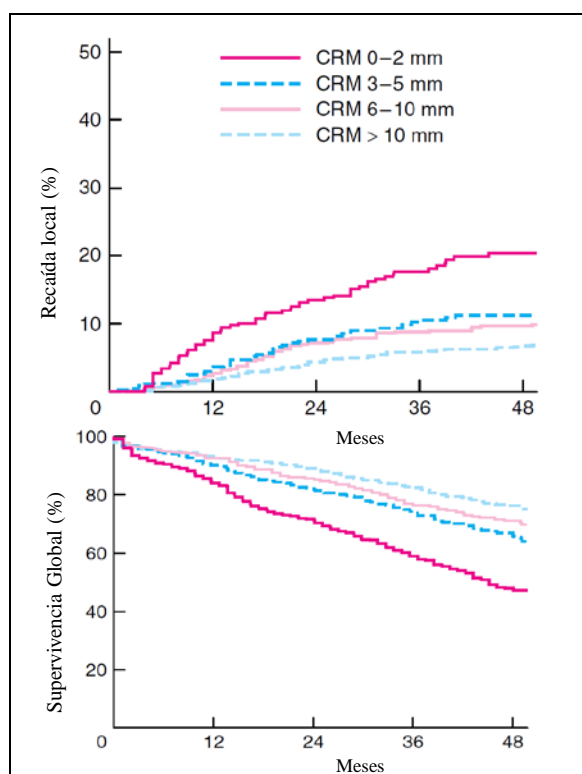
Se considera infraestadificación (del inglés *downstaging*) la diferencia entre el estadio clínico (cTcN) y el estadio patológico tras la neoadyuvancia (ypTpn). Esta medida surgió como forma de evaluar la respuesta al tratamiento de una forma individualizada comparando así los pacientes que responden con los que no (146). Sin embargo, a pesar de que los estudios iniciales sugirieron una correlación pronóstica (147) en la mayoría de los estudios prospectivos, el pronóstico va sujeto al resultado definitivo del ypTN y del margen de resección circunferencial, independientemente del estadio clínico previo (148). Una de las principales razones para la falta de correlación pronóstica de la infraestadificación es que en hasta un 30% de los casos el estadio clínico es infravalorado (149).

#### Margen de resección circunferencial

Desde la aceptación de la escisión total del mesorrecto (ETM) como técnica de elección para la cirugía del cáncer de recto, los resultados locales han mejorado sustancialmente. La clave de ésta técnica es que mejora significativamente las tasas de resección completa (R0) con una adecuada distancia al margen de resección circunferencial (CRM) (150). El CRM se

considera preoperatoriamente como la distancia del tumor a la fascia mesorrectal y esto se considera un factor pronóstico clave a la hora de valorar la posibilidad de recaída local. De esta manera, los tumores con una distancia al MRC < 2 mm. se consideran de mal pronóstico y tienen una elevada tasas de recaídas locales pero también peor supervivencia (Figura 9) (151, 152).

**Figura 9. Supervivencia global y recaída local según la distancia al margen de resección circunferencial (CRM). De ref (151)**

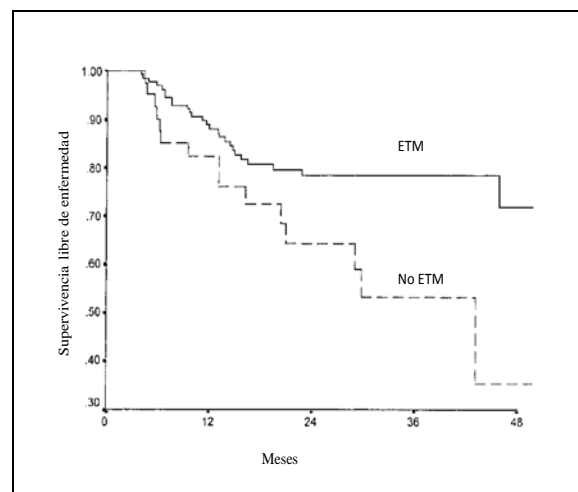


## 1.5.Tratamiento

El tratamiento del cáncer de recto ha evolucionado de forma significativa durante los últimos 20 años. El reconocimiento de que la alta incidencia de recidivas locales es debida a la falta de esterilidad tumoral del margen quirúrgico ha llevado al desarrollo de la resección total del mesorrecto (ETM). Esta

técnica consigue una notable disminución de las recidivas locales considerándose, en el momento actual, el tratamiento quirúrgico estándar del cáncer de recto de tercio medio y bajo (153, 154) (Figura 10). El concepto de ETM fue introducido por Heald en 1979 (155), reproduciendo otros autores los buenos resultados de su primera serie (156). La experiencia del cirujano es un factor de vital importancia en el éxito de la cirugía del cáncer de recto. Martling y cols. analizaron los resultados de los estudios Stockholm I y II en los que se había realizado cirugía convencional, y los resultados de los mismos cirujanos generales tras una formación en la técnica de ETM: el porcentaje de recidivas locales, a los dos años, disminuyó del 15% al 6% (157, 158).

**Figura 10. Supervivencia Libre de Enfermedad en función de la técnica quirúrgica.**



Actualmente existen nuevas técnicas de estudio, como la “resección cilíndrica abdomino-perineal” que podrían mejorar los resultados (159). El aspecto crítico es lograr un mesorrecto libre de enfermedad. La tasa de recaída local tras una cirugía óptima está relacionada con el estadio T y N, con tasas de recidivas locales del 20-40% en tumores localmente avanzados, sin afectación ganglionar o más limitados pero con ganglios positivos, y del 40-60% cuando están presentes los dos factores de riesgo (160). Estos

porcentajes son aplicables para el riesgo de enfermedad a distancia en función de la presencia de los mismos factores de riesgo anteriormente descritos. Se deduce, pues, la importancia de la definición del riesgo individual de recaída para decidir la pauta terapéutica.

### **Tratamiento del estadio I**

Estos pacientes tienen un excelente pronóstico con supervivencias a los 5 años por encima del 90%, por lo que el tratamiento exclusivamente quirúrgico se considera curativo. Generalmente los tumores de tercio superior y medio son candidatos a una resección anterior baja (RAB) por lo que se podrá preservar la función esfinteriana. Aquellos pacientes con tumores muy bajos pueden necesitar una amputación abdominoperineal (AAP) requiriendo una colostomía permanente (161). Otras de las complicaciones de la cirugía oncológica incluyen disfunción urinaria y sexual, alteración del ritmo intestinal, riesgo de dehiscencia e incontinencia. Por este motivo se han buscado otras alternativas quirúrgicas para el tratamiento de estos tumores como la resección local transanal (TAE) y la microcirugía endoscópica transanal (TEMS). A la hora de plantear estas alternativas quirúrgicas hay que tener en cuenta que la probabilidad de afectación ganglionar depende de la profundidad de invasión del tumor (T). Para los tumores T1 es del 0-13%, del 12%- 28% para los T2, del 33%-66% para los T3 y del 53-79% para los T4 (162-166). La trascendencia de estos datos reside en que con estas técnicas conservadoras no se resecan ganglios linfáticos. Otro dato a tener en cuenta a la hora de plantear una técnica conservadora es el tamaño tumoral, ya que tumores mayores de 3-4 cm. tienen una elevada incidencia de afectación ganglionar (167). Por último, los tumores con invasión linfovascular y pobremente diferenciados presentan un riesgo elevado de afectación ganglionar (168) por lo que no serán candidatos a TAE. Estudios

prospectivos demuestran que los pacientes sometidos a esta cirugía con tumores T1 de alto riesgo o T2 de bajo riesgo presentan unas tasas de recidiva local de hasta el 50% por lo que no se consideran candidatos adecuados (169-171).

En definitiva, las indicaciones para realizar una TAE/TEMS serán: tumores T1 de bajo grado menores de 4 cm, y por razones técnicas, que afecten a menos del 40% de la mucosa y estén a menos de 10 cm. del margen anal.

No obstante, cabe reseñar que, aunque presentan menos comorbilidad y sean técnicas adecuadas para pacientes en los que debido al elevado riesgo quirúrgico no sean candidatos a cirugías oncológicas, las resecciones locales presentan de forma global un riesgo de 3 a 5 veces mayor de recaída por lo que siempre se debe realizar una estrecha vigilancia (172).

En caso de realizar una RAB o AAP la cirugía laparoscópica parece tener resultados oncológicos similares a la cirugía abierta por lo que está indicada en manos de cirujanos adecuadamente entrenados (173)

### **Tratamiento de estadios II y III**

Los pacientes con estadios II y III se consideran de alta probabilidad de recaída por lo que son candidatos a tratamiento complementario. El tratamiento adyuvante de elección clásico era administrar quimioterapia basada en 5-fluorouracilo (5FU) junto con radioterapia local (45-50Gy) El beneficio de la quimioterapia asociada a la radioterapia quedó demostrado en cuatro ensayos clínicos realizados durante los últimos 20 años: EORTC, EORTC-22921, FFCD-9203 y el ensayo polaco (174-177). En el año 2009 se publicó un meta-análisis (178) que incluía estos 4 estudios. De forma global los pacientes que recibieron tratamiento solo con RT presentaron unas recaídas locales a los 5 años del 16,5% comparado con el 9,4% de los que recibieron tratamiento combinado (OR=0,53;  $p<0,001$ ). Como en los ensayos individuales, el

meta-análisis no mostró diferencias significativas en supervivencia global o supervivencia libre de enfermedad a distancia.

Una vez quedó claro que el tratamiento combinado de quimio-radioterapia era superior a la radioterapia sola, otros dos ensayos exploraron si era mejor administrarla pre- o post-operatoriamente. Ambos estudios (NSABP-R03 (179) y el alemán CAO/ARO/AIO 94 (180) coincidían en que la administración del tratamiento de forma preoperatoria era mejor, aunque los resultados específicos diferían significativamente. El ensayo alemán completó el reclutamiento con 823 pacientes que fueron aleatorizados a recibir quimio-radioterapia preoperatoria (con 5FU en infusión continua durante las semanas de tratamiento) o el mismo régimen postoperatorio. Los pacientes del primer grupo tuvieron significativamente menos recaídas locales (6% vs. 13%;  $p=0.006$ ), toxicidad aguda (27% vs. 40%;  $p=0.001$ ) y toxicidad crónica (14 vs. 24%;  $p=0.012$ ). Además se incrementó la tasa de preservación de esfínteres (39% vs. 20%;  $p=0.004$ ). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en las tasas de supervivencia global, que tras una actualización con un seguimiento de 11 años eran del 59% para ambos grupos (181).

El ensayo NSBP-R03 por su parte, tan sólo reclutó 267 pacientes de los 900 planeados inicialmente. Finalmente 123 pacientes fueron tratados con quimio-radioterapia preoperatoria y 131 con el mismo esquema post-operatorio. Los pacientes tratados de forma preoperatoria tuvieron una supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 5 años significativamente mayor: (64,7% vs 53,4%;  $p=0.011$ ) y una supervivencia global (SG) también mayor, aunque sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas (74,5% vs. 65,6%;  $p=0,065$ ). Sin embargo la incidencia de recaída local a los 5 años fue del 11% para ambos grupos. Dado que el reclutamiento de este ensayo fue significativamente menor al esperado, las

conclusiones que se puedan sacar están limitadas. Estos resultados no fueron confirmados por un estudio coreano en el que los pacientes se aleatorizaban a recibir tratamiento concomitante con 5FU o capecitabina, resultando la SG y la SLE similares así como las recaídas locales (3,7% vs. 6,2%;  $p=0,5$ ) (182).

Otra alternativa que ha demostrado ser válida como tratamiento preoperatorio es la radioterapia de ciclo corto en la que se administran 25 Gy en fracciones de 5Gy, siendo intervenido 7 días después. Existen dos ensayos clínicos que comparan esta estrategia con la quimiorradioterapia. En el estudio polaco (183) se aleatorizaron 312 pacientes a recibir radioterapia de ciclo corto o quimiorradioterapia habitual (con 5FU y 45Gy). No se encontraron diferencias significativas en control local o supervivencia aunque en el grupo de ciclo corto se encontró mayor incidencia de afectación del margen de resección circunferencial (4% vs. 13%;  $p=0,017$ ). El segundo estudio de Ngal y cols. (184) (185) aleatorizó 326 pacientes con tumores T3 (56% N- y 44%N+) aunque a diferencia del estudio anterior, todos recibieron quimioterapia adyuvante. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas de recurrencias locales, aunque eran clínicamente superiores en el grupo de RT de ciclo corto (7,5% vs. 4,4%;  $p=0.2$ ). La supervivencia global a los 5 años fue similar como en ensayos anteriores (74% vs. 70%). Dado que la radioterapia de ciclo corto no se puede administrar con quimioterapia concomitante, se han propuesto esquemas de tratamiento secuencial. En un ensayo fase II holandés, se administró tratamiento a 50 pacientes con metástasis potencialmente resecables, con radioterapia de ciclo corto, seguida de 6 ciclos de CAPOX (capecitabina + oxaliplatino) con bevacizumab. De los 41 pacientes que finalmente fueron intervenidos, el 44% obtuvieron regresión tumoral. (186). Estos resultados refuerzan la idea de que incluso con el ciclo corto, se puede obtener regresión tumoral,

aunque se necesitan ensayos de neoadyuvancia para confirmarlo. El ensayo clínico fase III RAPIDO ayudará a responder a esta pregunta administrando RT de ciclo corto seguida de QT neoadyuvante comparándolo con el esquema estándar de QT-RT.

Por el momento, la radioterapia de ciclo corto es un esquema frecuentemente en países del norte de Europa, mientras que en países anglosajones y del resto de Europa se utiliza la QTRT.

Dado que el principal fracaso del tratamiento se produce por la afectación metastásica, se han realizado multitud de ensayos clínicos con distintos quimioterápicos con el objetivo de mejorar los resultados. Sin duda el más explorado es el oxaliplatino, dado el beneficio mostrado en la adyuvancia del cáncer de colon con este fármaco. El estudio STAR-01 aleatorizó 747 pacientes a quimiorradioterapia con 50,4Gy + 5FU en infusión continua +/- oxaliplatino (60 mg/m<sup>2</sup> semanales) (187). Hubo un incremento significativo en la toxicidad grado 3 con oxaliplatino (24% vs. 8%  $p < 0,001$ ) sin mejora en las respuestas completas patológicas (pCR) (16%). En el estudio ACCORD, 598 pacientes se aleatorizaron a recibir 45Gy + capecitabina (800mg/m<sup>2</sup>) ó 50Gy + CAPOX (capecitabina (misma dosis) + oxaliplatino (50mg/m<sup>2</sup> semanales)). Tampoco se encontraron diferencias en la tasa de pCR (14% vs. 19%;  $p = 0,09$ ) aunque si una menor incidencia de afectación del CRM (19% vs. 10%;  $p = 0,02$ ). La tasa de toxicidad grado 3 fue también mayor en el grupo con oxaliplatino. Los resultados de supervivencia todavía no han sido comunicados (188). El NSABP R-04 es un estudio de 4 brazos con diseño 2x2 que aleatoriza pacientes a recibir 5FU en infusión continua vs. capecitabina y ambos con/sin oxaliplatino. De forma agrupada, la adición de oxaliplatino a 5FU o capecitabina no mejoró las pCR (21% vs. 19%) ni las cirugías con preservación de la función esfinteriana (60% vs. 64%) pero sí aumentó la diarrea grado 3 (15% vs. 7%) (189). El estudio alemán

CAO/ARO/AIO-04 aleatorizó 1265 pacientes a 50,4Gy + 5FU vs. 50,4Gy + 5FU+oxaliplatino (50mg/m<sup>2</sup> semanales). A diferencia de los estudios anteriores, en este ensayo sí que se incrementó la tasa de pCR con oxaliplatino (13% vs. 17%;  $p = 0,045$ ) sin incrementar significativamente la toxicidad grado 3 (23% vs. 22%). Por lo tanto, dado que 3 de 4 ensayos no demuestran incremento en la tasa de respuestas, el oxaliplatino no se utiliza en este contexto fuera de un ensayo clínico.

Las fluoropirimidinas orales han desplazado en la actualidad al tratamiento con 5FU tras ensayos como el NSABP R-04 que sugerían su equivalencia. Finalmente el estudio alemán de no inferioridad que comparó de forma directa 5FU en bolus con capecitabina continua, demostró que ambas eran comparables: SG a los 5 años del 67% vs. 75% respectivamente; recaídas locales: 14% vs. 12% (190).

Otro aspecto controvertido en el tratamiento de los estadios II/III es la necesidad de administrar quimioterapia adyuvante tras la neoadyuvancia y cirugía. Esta pregunta no ha sido respondida aún mediante ningún ensayo aleatorizado. Sin embargo, en la mayoría de estudios se permite la administración de quimioterapia adyuvante tras la cirugía durante 4 meses para completar un total de 6 meses tal y como se haría en el cáncer de colon. Un análisis retrospectivo de 2.724 pacientes de ensayos tratados con quimiorradioterapia neoadyuvante comparó aquellos que recibieron quimioterapia adyuvante (41%) con los que no (59%). El mayor beneficio fue en los pacientes que tuvieron buena respuesta, aunque con enfermedad residual (ypT1-ypT2 N0): HR: 0,61 (0,4-0,9), mientras que aquellos con pCR o tumores que no respondieron (ypT3-ypT4) no obtenían beneficio (191). Recientemente se ha publicado un meta-análisis que analiza los resultados de 21 ensayos clínicos en cáncer de recto que comparaban quimioterapia adyuvante vs. observación (algunos de ellos con quimiorradioterapia

neoadyuvante previa). Se obtuvieron resultados para 9785 pacientes tratados entre 1975-2011 con quimioterapia basada en 5FU. La quimioterapia adyuvante se asoció a una mejora de la supervivencia global del 17% y una mejora de la SLE del 25%, ambos independientemente del estadio II ó III (192). Por estos motivos esta generalmente aceptado que aquellos pacientes en los que se administra un tratamiento neoadyuvante, completan tratamiento adyuvante tras la cirugía.

Uno de los habituales inconvenientes para recibir la quimioterapia adyuvante es que muchos pacientes no son capaces de recibir todos los ciclos dado el deterioro que se produce de forma post-operatoria. Por este motivo se han propuesto esquemas de inducción que consigan administrar toda la quimioterapia previa a la cirugía. En un estudio fase II se observó que con 4 meses de inducción con CAPOX seguido de quimiorradioterapia habitual con capecitabina se conseguía una tasa de pCR del 24% y que globalmente el 97% de los pacientes respondían por RMN (193). En el ensayo del Grupo Cáncer de Recto 3 fase II aleatorizado se administró tratamiento con CAPOX x 4 ciclos antes de la QTRT con capecitabina a 54 pacientes y a 49

pacientes se les administró solo QTRT neoadyuvante antes de la cirugía, completando los 4 ciclos de CAPOX de forma adyuvante. Aunque la tasa de pCR fue la misma (14% vs. 13%), la toxicidad fue menor en el grupo de inducción (17% vs. 51%;  $p < 0,0001$ ) y además la capacidad de recibir todo el tratamiento también fue mayor en este grupo (93% vs. 51%;  $p = 0,0001$ ) (194)

El papel de las nuevas terapias en este contexto está todavía en discusión tras los fracasos de bevacizumab y cetuximab en el tratamiento adyuvante del cáncer de colon (195, 196). De hecho, el cetuximab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) no consiguió mejorar la tasa de pCR en pacientes KRAS no mutados en el fase II aleatorizado en combinación con CAPOX respecto a CAPOX solo (197). En la tabla 4 puede verse un resumen de los ensayos fase I/II realizados hasta la fecha. El bevacizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF), por su parte ha obtenido una elevada tasa de respuestas en este contexto, pero hasta la fecha no hay resultados de ensayos clínicos aleatorizados (Tabla 5)(198-201).

Tabla 4 Ensayos Clínicos Fase I/II con Cetuximab en Cáncer de Recto

Autor	N	Cetuximab	CRT	Diarrrea	pCR
<b>Machiels (202)</b>	40	Inducción + concomitante	C: 1650mg/m <sup>2</sup> /d + 45Gy	15%	5%
<b>Eisterer (203)</b>	31	Concomitante	C: 1650mg/m <sup>2</sup> /d + 45Gy	15%	0% %
<b>Velenik (204)</b>	37	Inducción + Concomitante	C: 1650 mg/m <sup>2</sup> /d + 45Gy	10%	8% %
<b>Chung (205)</b>	20	Concomitante + Aduyante	5FU 225 mg/m <sup>2</sup> /d + 50.4 Gy	10%	12%
<b>Bertolini (206)</b>	40	Inducción + Concomitante	5FU 225 mg/m <sup>2</sup> /d + 50.4 Gy	7,5%	8%
<b>Hofheinz (207)</b>	20	Concomitante	C: 1000 mg/m <sup>2</sup> /d + I: 40 mg/m <sup>2</sup> /sem + 50.4Gy	20%	25%
<b>Horisberger (208)</b>	50	Concomitante	C: 1000 mg/m <sup>2</sup> /d + I: 40 mg/m <sup>2</sup> /sem + 50.4Gy	30%	8%
<b>Hong (209)</b>	40	Inducción+ Concomitante	C: 1650mg/m <sup>2</sup> /d + I: 40 mg/m <sup>2</sup> /sem + 50.4Gy	5%	10%
<b>Cabebe (210)</b>	23	Concomitante	C: 1600 mg/m <sup>2</sup> /d + O: 100 mg/m <sup>2</sup> /3 sem + 50.4Gy	17%	17%
<b>Rödel (211)</b>	48	Inducción+ Concomitante	C: 1650 mg/m <sup>2</sup> /d + O: 50 mg/m <sup>2</sup> /sem + 50.4Gy	19%	8%
<b>TOTAL</b>	316			15%	9%

C: Capecitabina. O: oxaliplatino. I: irinotecan.

Tabla 5 Ensayos Clínicos Fase I/II con Bevacizumab en Cáncer de Recto

Autor	N	Bevacizumab	CRT	G3 Tox.	pCR
<b>Willet (198)</b>	32	Inducción + Concomitante	5FU 225 mg/m <sup>2</sup> /d CI + 50,4Gy	21%	16
<b>Crane (199)</b>	25	Concomitante	C: 1800 mg/m <sup>2</sup> /d + 50,4 Gy	0	32
<b>Czito (212)</b>	11	Concomitante	C: 1250 mg/m <sup>2</sup> /d + O: 50 mg/m <sup>2</sup> /sem + 50,4 Gy	27%	18
<b>Resch (213)</b>	8	Concomitante	C: 1650 mg/m <sup>2</sup> /d	25%	25
<b>Kennecke (214)</b>	42	Inducción + Concomitante	C: 1650 mg/m <sup>2</sup> /d + O: 50 mg/m <sup>2</sup> /sem + 50,4 Gy	24%	24%
<b>Avallone (215)</b>	28	Inducción + Concomitante	O: 100 mg/m <sup>2</sup> /sem + Raltitrexed 2,5 mg/m <sup>2</sup> +5FU 800 mg/m <sup>2</sup> + 50,4Gy	NS	55
<b>Dipetrillo (216)</b>	26	Inducción + Concomitante	XELOX + beva inducción x 2 + O: 40 mg/m <sup>2</sup> /sem + FU 200 mg/m <sup>2</sup> + 50,4Gy	76%	20%
<b>Nogué (201)</b>	47	Inducción + Concomitante	XELOX + beva inducción x 2 + C: 1650 mg/m <sup>2</sup> /sem + 50,4Gy	11%	36%
<b>TOTAL</b>	229			26%	23%

C: Capecitabina. O: oxaliplatino. Tox: toxicidad



## 7 Tratamiento del estadio IV

El cáncer de recto metastásico (estadio IV) se trata en la actualidad exactamente igual que el cáncer de colon. Clásicamente los ensayos clínicos no han distinguido entre estas dos enfermedades a la hora de incluir pacientes con enfermedad metastásica. Sin embargo en la actualidad existen protocolos específicos especialmente para aquellos pacientes con metástasis potencialmente resecables en los que se pueda plantear un tratamiento del tumor primario. La tendencia actual es administrar quimioterapia sistémica de combinación basada en fluoropirimidinas con oxaliplatino o irinotecan +/- agente biológico (bevacizumab o cetuximab/panitumumab si son KRAS no mutados) y si existe opción curativa plantear tratamiento del tumor primario en función de la estadificación local del recto.

### 1.6. Factores pronósticos y predictivos

Una de las principales preguntas que tanto el médico como el paciente se plantean ante una enfermedad es cual será el pronóstico. Un *factor pronóstico* aporta información acerca de la evolución de la enfermedad independientemente de nuestra actuación. Por otro lado, los *factores predictivos* serán aquellos que aportarán información pronóstica sólo ante determinada actitud terapéutica, es decir, nos ayudarán a

conocer la probabilidad que tiene un paciente de responder o no a un tratamiento específico. Aunque la diferencia teórica entre ambos conceptos parece bien clara, en medicina no siempre es sencillo conocer si determinado factor es solo pronóstico, predictivo e incluso ambas cosas. Por eso, en esta sección se expondrán de forma agrupada, especificando en cada caso de qué se trata. Existen otros tipos de "marcadores biológicos" útiles en la investigación oncológica. Los *farmacodinámicos* aportarán evidencia de un efecto farmacológico directo de una droga y los *surrogados* sirven como sustituto precoz de un beneficio clínico aunque estos dos últimos se utilizan en la investigación farmacológica principalmente.

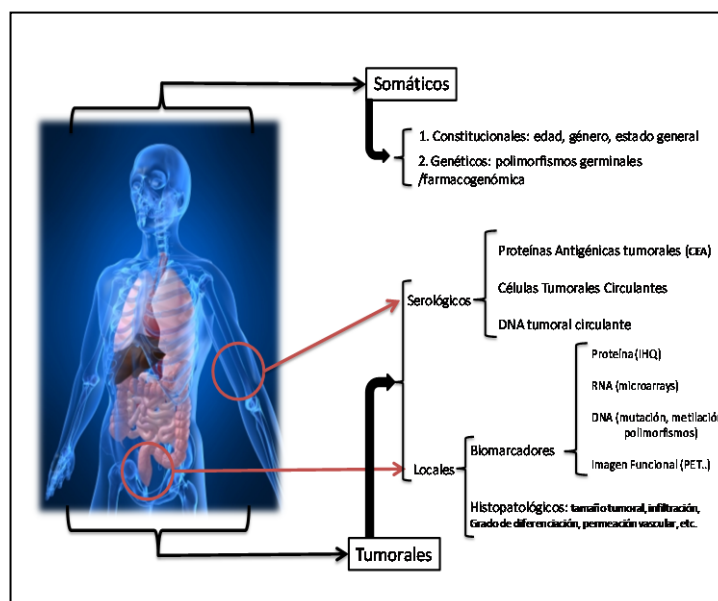
Conceptualmente podremos dividir los biomarcadores en dos grupos principales, los somáticos o propios del individuo y los tumorales, dependientes de la enfermedad.

Sin lugar a dudas, el factor pronóstico más importante en el cáncer de recto es el estadio basado en la clasificación TNM (Tabla 1). Los datos de 9.860 casos de cáncer de recto del *SEER (Surveillance Epidemiology and End Results)* estiman la supervivencia global a los 5

años del: 74% para el estadio I, 64% el estadio IIA, 51% el IIB, 32% el IIC, 74% el IIIA, 45% el IIIB, 33% el IIIC y 6% el IV (52). Otras

características histopatológicas como la infiltración vascular (217) o perineural (218) se consideran factores de mal pronóstico aunque su valor está supeditado al estadio y proviene de extrapolar estudios

Figura 11 Distribución Conceptual de Biomarcadores



de cáncer de colon y recto conjuntos.

### **Antígeno carcinoembrionario**

Los niveles séricos de antígeno carcinoembrionario (CEA) se consideran como factor pronóstico independiente en CCR (219). Después de la adopción del tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto, también se demostró que niveles elevados de CEA no sólo tenían valor pronóstico, sino también predictivo de respuesta: pacientes con niveles bajos (<2,5 ng/mL) tienen mayor probabilidad de responder al tratamiento con QTRT neoadyuvante (220, 221) [Sección 7.1].

### **Margen de resección circunferencial y grado de regresión tumoral**

Como se explica en el capítulo 1.4 (Evaluación Patológica del Tumor), tanto la afectación de la fascia mesorrectal como el TRG han demostrado ser factores pronósticos en el cáncer de recto estadio II/III.

### **Inestabilidad de microsatélites (MSI)**

Como se comenta en la sección 1.3 (Biología Molecular) las alteraciones en genes MMR se encuentran en los casos de HNPCC y en 15-20% de casos esporádicos. Los estudios en CCR demuestran que la presencia de MSI es un factor de buen pronóstico. Un análisis de 718 casos de CCR estadio II y III valoró la presencia de MSI mediante la tinción IHQ de las proteínas MLH1 y MSH2. Los casos con tinción negativa (por tanto "anormal": MSI) tenían una reducción del riesgo de muerte (HR: 0,26) que era independiente de recibir o no quimioterapia adyuvante (222). Dado que la incidencia de tumores con MSI en cáncer de recto es extremadamente baja, esto no parece ser un factor determinante. En un trabajo realizado sobre 990 cánceres de recto de todos los estadios tan solo se encontraron 50 casos MSI. En esta cohorte, los pacientes MSI tenían incluso un

pronóstico peor, aunque esto no ha podido ser comprobado en otras series (223).

### **Biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento neoadyuvante**

El cáncer de recto presenta una oportunidad única para estudiar biomarcadores. Desde la implantación del tratamiento neoadyuvante, nos proporciona un modelo de estudio en el que es posible analizar la muestra tumoral antes del tratamiento recogida mediante biopsia, y tras el tratamiento en la cirugía. Gracias a esto, se han realizado numerosos estudios intentando buscar biomarcadores con los que seamos capaces de predecir que pacientes responderán al tratamiento. En esta sección se comentarán los estudios más importantes hasta la fecha.

#### *EGFR*

El *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) es un receptor tirosín-kinasa implicado en el crecimiento celular de múltiples carcinomas. Estudios *in vitro* demuestran que la exposición de células tumorales a radiaciones ionizantes provocan la inmediata activación de la vía de señalización y que exposiciones repetidas producen una sobre-expresión del receptor (224-226). Los modelos celulares en los que se inhibe esta respuesta, presentan una sensibilidad mayor a las radiaciones (227). Por este motivo, se ha estudiado en profundidad si la expresión tumoral de EGFR tiene algún valor predictivo de respuesta al tratamiento neoadyuvante. Sin embargo, la mayoría de estudios traslacionales que se han realizado hasta la fecha, no encuentran un patrón común que asocie la expresión de EGFR con la respuesta al tratamiento o con el pronóstico de la enfermedad. Uno de los problemas de valorar la expresión mediante su tinción IHQ es la falta de estandarización. Como se ve en la tabla 6, algunos usan como "positividad" la expresión en más del 1%, 5% o del 20%. En cualquier caso la valoración del porcentaje es subjetiva y está por

tanto sometida a una elevada variabilidad inter-observador. El estudio de Bengala *et. al* (228) utiliza una técnica algo diferente, el número de

copias por FISH, aunque tampoco encuentran una correlación con la respuesta

**Tabla 6 Resumen de Estudios de EGFR**

Artículo	Número de muestras y prevalencia	Biomarcador analizado	Tratamiento neoadyuvante	Endpoint	Conclusión
<b>Spindler 2006 (229)</b>	n = 48 28/48 + (58%)	IHQ, + si >1 % de tumor . Células tinción +;	65 Gy/UFT /LV	TRG	No correlación
<b>Bertolini 2007 (230)</b>	n = 91 63.3% (+)	IHQ, + si >1% de tumor  células tinción +	50 Gy/FU	TRG/T-stage  downstaging	No correlación
<b>Giralt 2005 (231)</b>	n = 87 52/87 tumores eran + (60%)	IHQ, + si >5% de células tinción +;	45–50.4 Gy solo o + FU/LV o UFT/LV	pCR rate DFS/LR/OS	Tumores EGFR + menos tasas de pCR y peor SLE;  si >50% de células + EGFR peor SLE
<b>Giralt 2002 (232)</b>	N=45 (64%) tumores eran +	IHQ, + si >5% de células tinción +;	50.4 Gy solo o + 5FU	pCR	+EGFR pCR=3%  - EGFR pCR=38%
<b>Kim 2006 (233)</b>	n = 183 140/183 tumores eran + (76%)	IHQ, + si >1% de tumor  células tinción +;	50 Gy/FU/LV	TRG /T-downstaging	Baja expresión de EGFR asociada con mayor “T downstaging”
<b>Zlobec 2008 (234)</b>	N=104 39/88 tumores eran + (44%)	IHQ + si > 20% células tinción	HDRT 26Gy (6.5 Gyx4)	pCR	EGFR+ mayor pCR (45 vs 20%) p=0.003
<b>Bengala 2010 (228)</b>	N=146 >EGFR CN: 20%	EGFR GCN by FISH	50Gy/5FU o Capecitabina	pCR Downstaging	No correlación

IHQ: inmunohistoquímica. GCN: copias de número de genes. pCR: respuesta completa patológica.

Otras formas de analizar el estado de este receptor es mediante el estudio de sus polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Existe una variante del receptor que se produce por la sustitución de un nucleótido (G por A) en el codón 497 del subdominio IV que codifica la región extracelular que produce una sustitución de aminoácido (arginina por lisina) y conlleva una menor afinidad por el ligando (EGFR R497K). Este SNP ha sido estudiado junto a otro en el que se produce una repetición de nucleótidos (CA) en el exón 1 que alteran la expresión de EGFR. En el estudio sobre 59 pacientes se observó que aquellos con el genotipo Arg/Arg y bajas repeticiones de CA tenían SLE significativamente menor que aquellos con genotipo Lis/Lis y mayor número de repeticiones CA, aunque ninguno de ellos era predictivo por sí solo (235). Además un segundo estudio con 65 pacientes en el que se analizaba la relación de las repeticiones CA en el exón 1, entre otros marcadores, con el TRG no obtuvo ningún resultado significativo para este SNP (236). Un segundo SNP en la posición 216 se produce cuando se sustituye la G por una T lo cual incrementa la actividad del promotor un 30%. Este SNP tiene además, la ventaja de que puede ser detectado en sangre periférica por lo que era interesante conocer su valor pronóstico o predictivo. Spindler et. al lo analizaron en 77 pacientes y encontraron el genotipo TT en 11 de ellos (17%). De forma agrupada, aquellos pacientes que tenían genotipo GT o TT tuvieron una respuesta mayor (pCR o algunas células residuales) en el 22% de los casos comparado a los GG que la obtuvieron en el 10% de los casos. (229).

En resumen, los resultados de la IHQ son dispares y por lo tanto no parecen aportar ninguna información en el cáncer de recto. Los estudios de SNP son prometedores aunque todavía los resultados son preliminares y se requieren más estudios que contrasten estos resultados.

### *Angiogénesis*

La angiogénesis es un proceso básico de cualquier tumor para crecer más allá de 1 mm<sup>3</sup>. La hipoxia celular que se produce durante el crecimiento tumoral hace que se estimule la síntesis de factores proangiogénicos. La hipoxia en sí misma se considera un factor de resistencia a la radioterapia por lo que se considera un importante factor predictivo. Por este motivo se han buscado biomarcadores relacionados con la hipoxia tumoral y neoangiogénesis que se relacionen con la respuesta al tratamiento neoadyuvante. Se ha podido demostrar que en los tumores de recto tratados con quimio-radioterapia se produce una disminución de la expresión de HIF-1 $\alpha$  (237) aunque esto no ha demostrado tener implicaciones pronósticas (238). Otros estudios con IHQ de marcadores de metabolismo anaerobio (GLUT-1, LDH, PDK-1) también sugerían relación de éstos con la tasa de respuestas (239), sin embargo como ocurre frecuentemente en este tipo de estudios retrospectivos no han podido ser reproducidos (240). Esto mismo ocurre con la tinción IHQ de VEGF. Existen estudios retrospectivos que muestran una asociación de la inmunotinción negativa con las respuestas al tratamiento neoadyuvante (234) y otros que no encuentran ninguna asociación (241, 242). Tal y como ocurre con EGFR, se están también analizando los SNP en genes relacionados con la hipoxia y la angiogénesis y estudios preliminares sugieren que podrían tener alguna validez, aunque se requieren más estudios para poder extraer conclusiones (243).

### *Otros estudios de inmunohistoquímica*

La facilidad de realizar una tinción IHQ en la biopsia diagnóstica del cáncer de recto y posteriormente correlacionarla con la respuesta al tratamiento ha hecho que sean muchos los estudios que encuentran relación de algunos marcadores pero también que haya muchos otros estudios que no encuentren esta relación.

Una de las proteínas más estudiadas es p53 debido a su importancia en la tumorigénesis del cáncer de recto. Hasta la fecha hay 22 estudios publicados en los que se correlaciona la presencia de p53 mutado (tinción positiva por IHQ o PCR) en la biopsia pre-tratamiento con la respuesta. En 18 de ellos no se encontró ninguna correlación con respuesta ni con supervivencia, alguno de ellos con muestras de hasta 130 pacientes (244, 245). De los otros 4 estudios, en 3 de ellos se obtiene que la IHQ positiva para p53 se asocia con una mayor probabilidad de respuesta (246-248) y en el otro que esto se asocia con una menor probabilidad de respuesta (249).

Otra proteína interesante es Ki67, que sirve como marcador de proliferación celular. De los 14 artículos publicados tan sólo dos de ellos muestran una relación (244, 250-262). Kim et al. (252) obtuvieron que un índice de Ki67 alto (tinción positiva por cada 1000 células) se correlacionaba con mayor probabilidad de respuesta mientras que Jakob et. al. encontraron el resultado opuesto (251). Parece, por tanto que el índice de proliferación Ki67 no aporta información predictiva.

La proteína p21 es el producto del gen supresor de tumores CDKN1A que responde ante un daño celular deteniendo el ciclo celular en G1. Estudios *in vitro* sugieren que las células con baja expresión de p21 son más sensibles a la radioquimioterapia. De los 8 estudios en los que se ha analizado la expresión de p21 en biopsias de cáncer de recto, 4 de ellos no obtuvieron ninguna correlación (244, 246, 250, 263) mientras que de los otros 4, en 2 de ellos la tinción positiva se asocia a mayor respuesta (230, 257) y en los otros dos ésta se asocia a peor supervivencia (254, 256).

La apoptosis celular también ha sido objeto de estudio como posible factor predictivo de respuesta. En un estudio exploratorio con 44 pacientes de ensayo CAO/AIO/ARO-94 Rodel

et.al. encontró que un elevado índice apoptótico se correlacionaba con una mayor regresión tumoral (258). Sin embargo posteriormente en un estudio mayor con 201 pacientes no se pudo demostrar esta asociación (264). Sin embargo en este estudio el índice apoptótico no se midió mediante la técnica TUNEL como en el estudio de Rodel sino que se utilizó la inmunotinción M-30. Dado que la medición directa de la apoptosis celular proporcionaba resultados dispares, también se ha analizado el papel de productos proteicos implicados en la apoptosis, en especial bax, bcl-2 y survivin.

Estudios *in vitro* sugieren que la inducción de bax confiere sensibilidad a la quimioterapia (265). Chang et al, encontraron en una cohorte de 130 pacientes que los tumores bax positivos tenían mayor frecuencia de pCR (244). En otros dos estudios, no se pudo confirmar esta correlación (253, 256). También la sobre-expresión de bcl-2 ha demostrado *in vitro* conferir resistencias al tratamiento con quimio y radioterapia. Sin embargo en los estudios en cáncer de recto no se ha podido correlacionar con la respuesta al tratamiento: de 12 estudios, 11 no encuentran ninguna relación (244, 246, 250, 252-254, 257, 266-268).

La survivin es una proteína inhibidora de la apoptosis que ha demostrado tener un papel fundamental en la regulación de las células del CCR (269, 270). Su papel regulador en la resistencia celular a la radioterapia quedó patente en un estudio *in vitro* con células de CCR resistentes a la RT a las que se les trató con RNA de interferencia para esta proteína observándose que se revertía la resistencia (271). Posteriormente Sprenger et. al. analizaron la expresión por IHQ de survivin en 116 pacientes con cáncer de recto y aunque no existía una relación clara con la respuesta tumoral medida por TRG, sí que se correlacionó su positividad con una menor supervivencia, por lo que podría tener implicaciones pronósticas (272).

Por último, cabe destacar que uno de los principales inconvenientes de la investigación de biomarcadores es no solo la variabilidad interobservador, sino también la variabilidad intratumoral en la expresión de la proteína estudiada. En un trabajo anterior, nuestro grupo analizó la expresión de diferentes proteínas (EGFR, VEGF, p53, Ki67 Y CD133) en los tumores resecados de 148 pacientes con cáncer de recto tratado con quimio-radioterapia neoadyuvante (262). Se utilizó la técnica de tissue-microarrays para la valoración de la inmunotinción, técnica con la que se selecciona un cilindro de 0,6 mm de diámetro. Se observó que la expresión de CD133 tenía valor pronóstico. Sin embargo, cuando esta tinción se aplicó a toda la pieza de biopsia, los resultados variaban y se perdía la significación pronóstica. Esto resalta la dificultad de generalizar resultados individuales de biomarcadores medidos por IHQ, y la importancia de realizar estudios de validación.

### *Estudios de Imagen*

Otra de las posibles aplicaciones de las nuevas técnicas de imagen es correlacionar ciertos parámetros con la probabilidad de respuesta al tratamiento neoadyuvante. La imagen normal adquirida mediante TAC o RMN puede ser útil ya que el menor tamaño tumoral y los tumores cN negativos tienen mayor probabilidad de responder, aunque esto no sea más que producto de una menor carga tumoral (220, 273). Los estudios funcionales podrían aumentar la información sobre las técnicas clásicas. La RMN de difusión se ha propuesto para valorar los cambios precoces al tratamiento con quimio-radioterapia ya que mediante esta técnica se pueden detectar cambios microscópicos antes de que se produzca una reducción tumoral franca. En un estudio exploratorio, Sun et.al (274) observaron que los tumores que tenían una buena respuesta patológica, presentaban un menor coeficiente de difusión aparente antes del tratamiento y presentaban un incremento precoz

de este. Esto podría ser útil a la hora de seleccionar pacientes para el tratamiento o desestimar los no-respondedores de forma precoz, aunque todavía faltan estudios de validación.

El estudio de la actividad metabólica mediante 18-FDG-PET también podría, hipotéticamente, dar información acerca de que tumores son más activos y por tanto más probable que respondan al tratamiento. De hecho se ha comprobado que la QRT preoperatoria disminuye la captación (SUV) de los tumores rectales (275). Desafortunadamente estudios posteriores han mostrado que el SUV pre-tratamiento no se correlaciona con la respuesta y que además el SUV pos-tratamiento no se correlaciona con el estadio patológico (276). La captación de 18-FDG peritumoral por células inflamatorias provoca frecuentemente falsos negativos, lo cual limita la interpretación de esta técnica como factor predictivo (277).

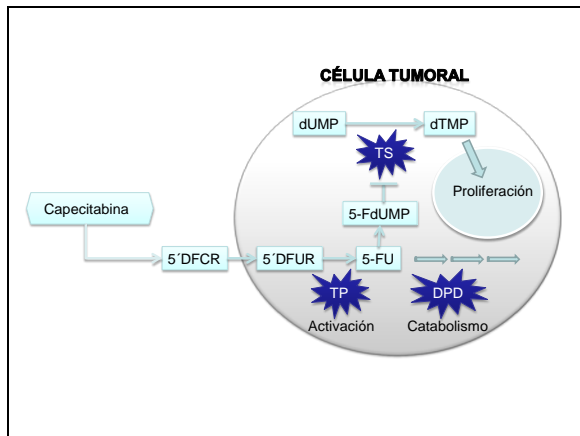
Como se ha comentado previamente la hipoxia tumoral afecta de forma negativa la efectividad de la radioterapia. Se ha utilizado la PET con un marcador metabólico de hipoxia: 60-Cu-ATSM. Existe hasta la fecha un estudio piloto con este trazador que muestra en 19 pacientes que aquellos que presentan mayor hipoxia mediante esta técnica, tienen menos probabilidad de responder (278). Aunque prometedores, se requieren más estudios para conocer el verdadero valor predictivo de esta técnica en este campo

### **Biomarcadores específicos de tratamiento**

Otra técnica para encontrar biomarcadores predictivos, es dirigir la investigación hacia el metabolismo o mecanismo de acción específico del tratamiento quimioterápico que se va a administrar. Como se ha comentado antes, durante los últimos 20 años las fluoropirimidinas han sido la piedra angular del tratamiento concomitante con la radioterapia. Por lo tanto su

metabolismo ha sido ampliamente estudiado con el fin de encontrar biomarcadores predictivos. La timidilato sintasa (TS) es la enzima que cataliza la producción de nucleótidos de timina necesarios para la síntesis de DNA y es una de las dianas del 5FU (VER FIGURA). La alta expresión de TS en biopsias pre-tratamiento ya sea medida por IHQ (279) o por expresión de mRNA (251) se ha correlacionado con una falta de respuesta al tratamiento neoadyuvante con 5FU-RT.

**Figura 12 Metabolismo Fluoropirimidinas**



El número de repeticiones en tándem en la región promotora de TS afecta a la eficacia de traducción de la proteína de forma que un mayor número de repeticiones provoca un incremento en la expresión (280). Los pacientes con repeticiones triples de esta secuencia (TS3 / 3) presentaron una respuesta menor que los pacientes con secuencias más cortas (2/2 o 2/3) en un trabajo retrospectivo con 65 pacientes con cáncer de recto tratados con 5FU-RT (281). Por este motivo, se propuso un ensayo clínico prospectivo en cáncer de recto en el que se aplicaba el tratamiento neoadyuvante según el estado de TS: aquellos pacientes con genotipos con pocas repeticiones en alguno de sus alelos (\*2) eran tratados con el esquema habitual de 5FU-RT. Los pacientes con más repeticiones (\*3 o \*4) eran considerados de alto riesgo y se les trataba con 5FU-RT + irinotecan. Se

incluyeron 135 pacientes e interesantemente el grupo de alto riesgo se igualó al de bajo riesgo en respuestas (downstaging 64% para ambos) y obtuvieron la misma SLE y SG (282). No obstante, se requiere un estudio aleatorizado con brazo control para confirmar estos resultados antes de poder aplicarlo en la práctica diaria.

La enzima limitante en el catabolismo de las fluoropirimidinas es la dihidropirimidin deshidrogenasa (DPD). La baja actividad de DPD intratumoral se asocia a una mayor tasa de respuestas a 5-FU *in vitro* (251) y en xenoinjertos (252). Estos hallazgos preclínicos se encuentran en concordancia con el hallazgo de que el nivel de expresión de DPD en muestras tumorales de pacientes se relaciona con la tasa de respuestas a 5-FU en cáncer de colon. Por otro lado, la timidina fosforilasa (TYMP) es la enzima limitante en la metabolización de fluoropirimidinas orales como la capecitabina en 5FU intracelular (Figura 12). En un estudio exploratorio estas dos enzimas mostraron utilidad a la hora de predecir la respuesta al tratamiento neoadyuvante con capecitabina-RT en cáncer de recto, de forma que un ratio mayor TYMP/DPD se asociaba a mayor porcentaje de respuestas (283).

Como conclusión cabe decir, que el estudio de las enzimas implicadas en el metabolismo de fluoropirimidinas resulta prometedor, aunque todavía no se utilizan en la práctica diaria. Es de esperar, que a medida que los tratamientos quimioterápicos mejoren, se tienda a utilizar en menor medida quimioterapia no dirigida por lo que estos biomarcadores irán perdiendo interés.

#### *Anti-EGFR en cáncer de recto*

Los anticuerpos monoclonales que inhiben la dimerización de EGFR, cetuximab y panitumumab, han demostrado actividad en CCR metastásico. Aunque inicialmente los ensayos clínicos incluían pacientes con tumores inmunohistoquímicamente positivos para EGFR,

posteriormente se observó que esto no tenía ninguna capacidad predictiva para predecir beneficio, a diferencia de las mutaciones de KRAS: los pacientes podían responder independientemente de su resultado de EGFR por IHQ, pero si KRAS estaba mutado, no obtenían beneficio clínico (284-286).

En cáncer de recto, el cetuximab es el anticuerpo anti-EGFR más estudiado. Sin embargo, en los estudios fase II, la tasa de pCR ha resultado incluso menor a la habitual (tabla 4 en sección 1.5: Tratamiento de estadios II y III) con una media del 9%. Cuando de forma retrospectiva se ha analizado la influencia de KRAS en la tasa de respuestas no se han visto diferencias como en el estudio de Bengala et. al (228) donde el 62% de los pacientes con KRAS no mutado tuvieron un downstaging, mientras que los pacientes con mutaciones de KRAS lo obtuvieron en el 57% de los casos. Estos resultados reflejan probablemente el limitado aporte de este anticuerpo a la respuesta en este contexto. También se ha postulado que el estado de BRAF y otras proteínas de la cascada de señalización de PI3K como PTEN pueden influir en la eficacia de este anticuerpo, sin embargo en cáncer de recto, las mutaciones de BRAF son escasas y en un estudio diseñado para responder a esta cuestión, no se encontró ningún caso de cáncer de recto con mutación de BRAF y el estado de PTEN era independiente de la respuesta (287). Sí que se ha visto que cetuximab produce alteraciones en la expresión génica, viéndose en un estudio que tras el tratamiento se modificaba la expresión de genes de proliferación (*PIK3R1*, *CGREF1*, *PLAGL1*), y de invasión celular (*SERPINE2*, *TNS4*, *S100A6*) (288).

En conclusión, el fracaso de estos anticuerpos en la adyuvancia del cáncer de colon, y las limitadas respuestas vistas en los fases II, hacen que la investigación actual, se centre en encontrar factores predictivos de respuesta. De esta manera, podremos seleccionar

correctamente los pacientes que puedan beneficiarse de estos tratamientos.

### *Bevacizumab en cáncer de recto*

Como se comentó en la sección 1.5, el bevacizumab ha obtenido más respuestas objetivas en el tratamiento neoadyuvante del cáncer de recto que los anti-EGFR. Sin embargo, hasta la fecha no se conoce ningún factor predictivo de respuesta para este anticuerpo lo cual, dado el aumento relativo de la toxicidad que produce, hace que se limite la investigación en este campo.

El biomarcador más prometedor en este contexto es la presencia en suero del receptor soluble tipo 1 de VEGF (sVEGFR-1). Éste es un inhibidor endógeno de la angiogénesis que actúa atrapando al VEGF circulante. Un análisis exploratorio retrospectivo de un ensayo clínico en neoadyuvancia con 5FU-RT-bevacizumab, mostró que los niveles de sVEGFR-1 se correlacionaban con la respuesta al tratamiento de forma que los pacientes con mayores niveles en suero obtenían menor respuesta (289). En otro ensayo clínico fase II, se obtuvieron resultados similares, los niveles de sVEGFR-1 en suero eran mayores entre los pacientes que no tuvieron *downstaging* (198).

### **Técnicas moleculares no dirigidas**

Debido a la falta de éxito en la búsqueda de biomarcadores predictivos de respuesta de forma dirigida, se han buscado otras alternativas para identificar qué pacientes se beneficiarán del tratamiento neoadyuvante. Se han utilizado diversas técnicas para determinar las diferencias entre respondedores y no respondedores: proteómica (estudio de las kinasas activadas), genómica (estudios de expresión de RNA) y cromosómica (estudios de alteraciones cromosómicas).



### Proteómica

Es bien conocido como el daño que se produce en DNA por la quimioterapia y especialmente por la radioterapia, activa rápidamente kinasas implicadas en vías de señalización reguladoras del ciclo celular. Por este motivo Folkvord y cols. analizaron las vías activadas en las biopsias pretratamiento para intentar identificar las diferencias entre respondedores y no-respondedores. Para esto usaron una técnica de fosfo-proteómica que consiste en detectar las kinasas fosforiladas y, por tanto activadas, con un microarray de proteínas (Tyrosine Kinase PamChip96 Array). Este kit contiene 144 kinasas y lo aplicaron a muestras de 67 pacientes que habían recibido tratamiento neoadyuvante con CAPOX+RT. El perfil se desarrolló comparando los buenos respondedores con los no respondedores y posteriormente se aplicó en el set de validación para diferenciar los buenos de los respondedores intermedios donde clasificó correctamente el 85% de los casos. El perfil se componía de 86 kinasas e interesantemente muchas de ellas pertenecían a las vías de señalización de VEGF y de PI3K (290). Además, en un estudio posterior sobre esta cohorte, se comprobó que los pacientes cuyos "perfiles" de expresión de kinasas presentaban mayor resistencia a la inhibición con el antiangiogénico sunitinib *ex-vivo*, tendían a presentar enfermedad metastásica precoz(291).

### Cromosómica

Las nuevas técnicas de determinación del cariotipo de alta resolución como el array-CGH (comparative genome hybridization) han permitido el estudio de alteraciones cromosómicas con elevada precisión permitiendo detectar microdelecciones de hasta 200 pares de bases (pb).

Un estudio exploratorio con 51 pacientes tratados con 5FU-RT encontró diferencias entre respondedores y no-respondedores en regiones

cromosómicas específicas: 2q21, 3q29, 7p22-21, 7q21, 7q36, 8q23-24, 10p14-13, 13q12, 13q31-34, 16p13, 17p13-12 y 18q23. Sin embargo, no se produjo un perfil claramente diferenciador basado en las alteraciones cromosómicas. Posteriormente se realizó otro estudio más amplio con muestras de 95 pacientes tratados en un ensayo fase II con 5FU-RT. En éste, se observó que las regiones cromosómicas más comúnmente afectadas por ganancias eran 20q11.21-q13.33, 13q11.32-23, 7p22.3-p22.2, y 8q23.3-q24.3 y las deleciones se encontraban en 18q11.32-q23, 17p13.3-q11.1, 10q23.1, y 4q32.1-q32.3. Los 25 pacientes que obtuvieron una pCR tenían menos ganancias de copias que los pacientes sin pCR ( $p=0,01$ ). La pérdida de la región 5q11.1-q26.3 se asociaba significativamente con la ausencia de pCR, mientras que la pérdida en 12p13.31 se asociaba con la pCR ( $p<0,001$  ambos) (292).

### Genómica y perfiles de expresión

El análisis de la secuencia del DNA en busca de mutaciones/polimorfismos que nos ayuden a identificar subtipos moleculares del cáncer es una estrategia utilizada en muchos tumores. El cáncer de recto es, sin embargo, un tumor molecularmente complejo y heterogéneo de forma que no se ha podido identificar una mutación que produzca adicción génica y sea por tanto "diana" como sucede en otros tumores. No obstante, sí que se han determinado "perfiles de mutaciones" asociados con respuesta/resistencia a la quimio-radioterapia neoadyuvante. En un estudio exploratorio con 132 pacientes se vio que ningún paciente con mutaciones en p53 y KRAS simultáneamente tuvo una pCR. También la presencia de mutación cyclina D1 G870A o el polimorfismo en la metilentetrahidrofolato reductasa C677T eran predictivos de no-respuesta al tratamiento (293).

Sin embargo, la secuencia del DNA es complicada de relacionar con la actividad

celular, ya que la expresión está regulada por múltiples factores incluyendo los epigenéticos. Por este motivo comenzaron a surgir los estudios de expresión génica para determinar los genes que se expresaban mediante la detección del mRNA. Inicialmente, los *microarrays* de ADN se aplicaron de una manera no supervisada, es decir, sin una selección previa con genes cuya expresión se sabe alterada en CCR, por lo que proporcionaban una información muy global. Aún así, definieron perfiles de expresión que permitían diferenciar entre mucosa colónica normal, adenoma o carcinoma (294, 295).

El empleo de datos supervisados implicaba trabajar con una muestra inicial (*training set*) y posteriormente validar los resultados (*validation set*). Se mostraron así diferentes perfiles génicos para cáncer de colon derecho o izquierdo, incluso según si asociaban o no MSI (296, 297). Pese a que la información generada no tuvo más que un mero interés biológico, en su conjunto estos trabajos han tenido repercusión clínica al distinguir grupos de mal pronóstico o con más riesgo para la aparición de metástasis en los que aplicar tratamientos más agresivos y realizar seguimiento más estrecho.

Han encendido, además, una luz para el estudio de las rutas moleculares que participan en la transformación del epitelio colónico y han permitido identificar posibles dianas terapéuticas. Además los perfiles de expresión génica no sólo sirven para determinar la resistencia intrínseca y la probabilidad de respuesta a los tratamientos, sino para analizar las rutas moleculares que se activan o se reprimen por la acción de un determinado agente quimioterápico, e incluso las modificaciones de los genes antes y después de los tratamientos.

El primer trabajo en este campo fue publicado por Ghadimi y cols. (298) En ese trabajo, se extrajo el RNA de biopsias de 50 pacientes tratados en el ensayo CAO/ARO/AIO-94. Comparando los respondedores de los no respondedores en el *training set* obtuvieron un perfil de 54 genes. Posteriormente se aplicó a la muestra de validación prediciendo la respuesta en el 83% de los casos. Posteriormente se publicaron ensayos de características similares (Tabla 7) con la peculiaridad de que a pesar de utilizar plataformas casi idénticas para la detección del mRNA, los resultados no han producido en ningún caso genes similares (299-301). Desafortunadamente, ninguno de estos perfiles de expresión ha resultado útil en la práctica ya que no han podido ser validados. En un trabajo reciente con 51 pacientes tratados con neoadyuvancia estándar basada en 5FU-RT, los autores incluyeron todos los genes de los perfiles anteriores. Cuando aplicaron los distintos perfiles a su muestra obtuvieron unos resultados bastante pobres en sensibilidad y especificidad: 21% y 37% para el de Ghadimi, 50% y 70% para el de Kim y 33% y 30% para el de Rimkus respectivamente (302).

Nuestro grupo, en un trabajo preliminar, ha seguido una estrategia diferente para ese mismo fin. En una primera fase que se denominó de cribado ciego, se realizó un trabajo con SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) mediante el cual se analizaron los genes que se modificaban de forma significativa con el tratamiento en una muestra de 3 pacientes. Mediante esta técnica, se es capaz de analizar todo el transcriptoma sin necesidad de un conocimiento previo, por lo que permite "descubrir" genes que se puedan regular en el proceso.

Tabla 7 Perfiles de Expresión Génica en Cáncer de Recto

	<b>Ghadimi et al (298)</b>	<b>Watanabe et al (301)</b>	<b>Kim et al (299)</b>	<b>Rimkus et al (300)</b>	<b>Casado et al (5)</b>
<b>Pacientes (Training + Testing)</b>	30 (23+7)	52 (35+17)	46 (31+15)	43	94 (57+37)
<b>Tratamiento</b>	5-FU – RT	RT sola	5-FU – RT  XELIRI – RT  Cape - RT	5FU-RT	5-FU – RT TOMOX – RT UFT – RT
<b>Plataforma</b>	NCI cDNA / oligonucleotidos	cDNA u95Av2 GeneChip	Affymetrix  GeneChip® Human Genome U133A cDNA GeneChip	Affymetrix  GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array	SAGE RT-PCR (TLDAAs)
<b>Endpoints</b>	T downstaging (sí vs no)	<i>Japanese regression grade</i> (0, 1 vs. 2,3)	Dworak's TRG (4 vs. 1,2,3)	Becker's TRG (<10% vs. >10%)	Dworak's TRG (0/1 vs. 2,3,4) y SLE
<b>Genes del predictor</b>	54	33	95	42	13
<b>Eficacia</b>	Sensibilidad 78%  Especificidad 86%	Sensibilidad 71%  Especificidad 93%	Sensibilidad 100%  Especificidad 82%	Sensibilidad 71%  Especificidad 86%	Sensibilidad: 87% Especificidad: 82% HR: 4.35

De esta primera fase se concluyó que 24 genes eran potenciales candidatos regulados por el tratamiento neoadyuvante y se analizaron junto con 29 genes más incluidos de la literatura, en biopsias de 125 pacientes que recibieron tratamiento neoadyuvante. Mediante esta técnica combinada en dos fases se obtuvo un perfil de 13 genes que no solo era capaz de predecir la respuesta al tratamiento, si no también era factor pronóstico de SLE. Este perfil está siendo validado en la actualidad con muestras

procedentes de pacientes tratados en ensayos clínicos.

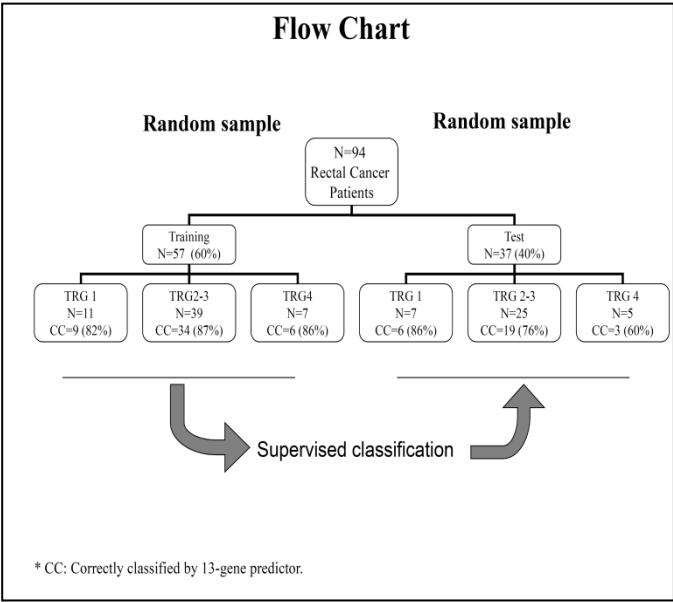


Figura 13 Predictor de Respuesta a la Quimio-radioterapia de 13 genes

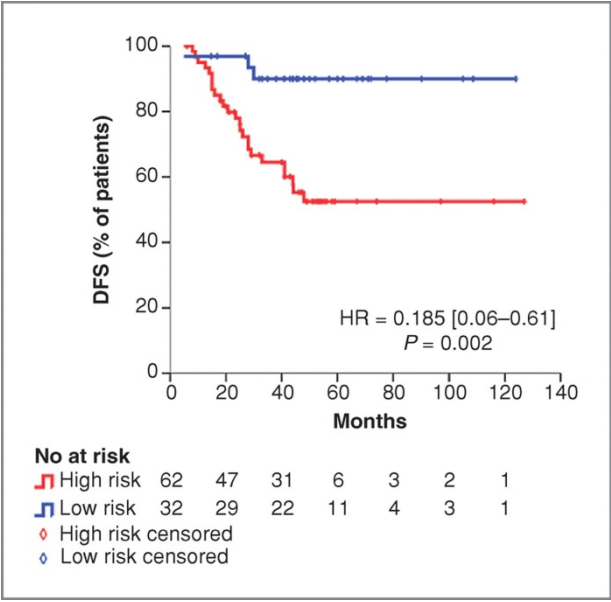


Figura 14 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del predictor de 13-genes

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



---

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 2.1 Hipótesis del trabajo

---

El tratamiento con quimio-radioterapia neoadyuvante en los estadios II y III del adenocarcinoma de recto, seguido de cirugía con escisión total del mesorrecto ha conseguido que el control local sea excelente y por lo tanto que los fracasos terapéuticos procedan de las recaídas a distancia.

En un trabajo exploratorio anterior mediante una técnica de cribado ciego (SAGE) se observó que existían genes que alteraban su expresión después del tratamiento con quimio-radioterapia en tres pacientes. Además, en un trabajo posterior, se observó que la expresión de determinados genes en la biopsia pre-tratamiento tenía valor predictivo de respuesta y pronóstico de supervivencia libre de enfermedad (5).

Con estos antecedentes nos planteamos si la modificación de la expresión génica tumoral por el tratamiento neoadyuvante puede ser indicador de genes que confieran resistencia terapéutica.

- *Hipótesis del trabajo*: la modificación en la expresión génica del adenocarcinoma de recto por el tratamiento neoadyuvante con quimio-radioterapia está condicionada por genes de resistencia al tratamiento y orientará por tanto a potenciales dianas terapéuticas.

- *Hipótesis nula* del trabajo: la modificación en la expresión génica del adenocarcinoma de recto por el tratamiento neoadyuvante con quimio-radioterapia es independiente de genes de resistencia al tratamiento.

### 2.2 Objetivos del trabajo

---

1. Estudiar la expresión de un determinado número de genes en un grupo de pacientes con adenocarcinoma de recto en estadios II y III tratados con QT-RT preoperatoria, antes y después de dicho tratamiento.

2. Correlacionar parámetros clínicos y patológicos con parámetros pronósticos como la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad.

3. Correlacionar la modificación en la expresión génica con parámetros pronósticos como la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad.

4. Analizar la relación entre la expresión génica y la expresión proteica final para señalar potenciales dianas terapéuticas.

5. Estudiar los mecanismos por los que los genes seleccionados como potenciales dianas terapéuticas producen resistencia al tratamiento *in vitro*.





# MATERIAL Y MÉTODOS

---



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Pacientes y muestras clínicas

Tras la aprobación del proyecto de investigación por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz se recogieron de manera retrospectiva las características clínicas y anatomopatológicas de 108 pacientes diagnosticados entre 2000 y 2004 de un adenocarcinoma de recto tratados según los protocolos de neoadyuvancia vigentes en el Hospital La Paz, así como 21 pacientes análogos del Hospital *Clinic* de Barcelona para hacer un total de 129 pacientes incluidos en el estudio.

Los procedimientos diagnósticos realizados en todos los pacientes, incluyen una endoscopia diagnóstica con biopsia, una RMN pélvica o ecografía endorrectal y un TAC toraco-abdominal (o radiografía de tórax si solo abdominal).

#### *Criterios de Inclusión*

Se establecieron los siguientes criterios de inclusión de casos:

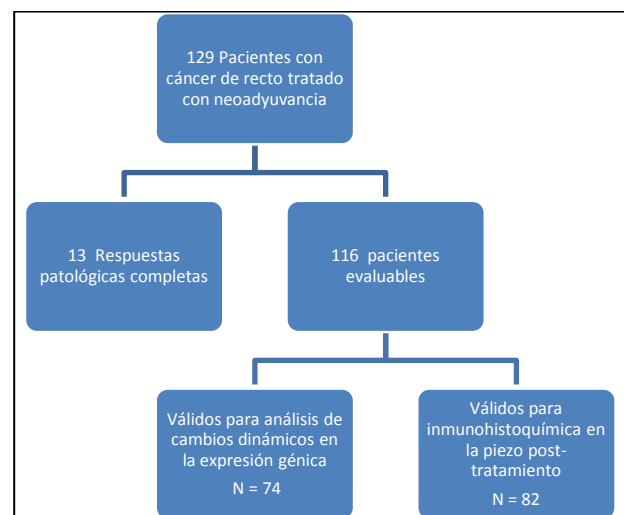
- Diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinoma de recto.
- Disponibilidad de muestra conservada en parafina de la endoscopia diagnóstica
- Disponibilidad de muestra conservada en parafina del espécimen quirúrgico.
- Estadio II o III de la AJCC. También se permitía estadios I si se incluyeron en la vía clínica de neoadyuvancia para evitar una amputación abdominoperineal. No se incluyeron pacientes con estadios IV.
- Tratamiento local óptimo, definido como:
  - Radioterapia de 45 Gy con *boost* de 5 Gy sobre masa tumoral (haber recibido al menos 85%)
  - Quimioterapia concomitante con la radioterapia (haber recibido al menos un ciclo).

- Incluidos en una vía clínica donde se tenía como objetivo la escisión total del mesorrecto.

De todos los pacientes se seleccionaron una muestra de endoscopia diagnóstica previa al tratamiento con quimiorradioterapia y una muestra de tumor primario correspondiente a la cirugía conservadas en parafina.

Como puede verse en la Figura 15, de estos 129 pacientes fue posible el análisis comparativo del RNA antes y después del tratamiento en 74 pacientes (13 excluidos por respuesta patológica completa y en 42 casos no se pudo extraer RNA de una de las dos muestras), y se pudo realizar tinción IHQ en las piezas quirúrgicas (post-tratamiento) en 82 casos.

**Figura 15 Pacientes incluidos en el trabajo**



Las características clínicas y anatomopatológicas recogidas fueron:

- Edad al diagnóstico (años)
- Fecha de diagnóstico
- Estadio TNM clínico al diagnóstico.

- Diámetro circunferencial de tumor, utilizando los datos de ecografía

endorrectal y endoscopia.

- Centímetros, medidos desde el margen anal, a los que se encontraba el tumor.

- Estadío TNM en la pieza quirúrgica (ypTNM).

- Número de ganglios extirpados en la intervención quirúrgica

- Estado general previo al tratamiento (ECOG).

- CEA previo al tratamiento

- Numero de plaquetas previo al tratamiento

- Tipo de intervención quirúrgica

- Complicaciones de la intervención quirúrgica

- Fecha de la cirugía

- Esquema de quimioterapia neoadyuvante administrado.

- Fecha de inicio del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

- Complicaciones de la quimioterapia neoadyuvante

- Dosis de quimioterapia neoadyuvante

- Número de ciclos de tratamiento neoadyuvante

- Tratamiento con radioterapia: esquema utilizado

- Fechas del tratamiento con radioterapia

- Complicaciones de la radioterapia

- Reducción o suspensión del tratamiento radioterápico

- Esquema de quimioterapia adyuvante

- Fecha de inicio de la quimioterapia adyuvante

- Toxicidad del tratamiento adyuvante

- Número de ciclos de adyuvancia administrados

- Reducción de dosis de tratamiento adyuvante

- Recaída:

- o Local o a distancia (sitio)

- o Fecha

- Supervivencia global, calculada desde la fecha de diagnóstico a la fecha de muerte.

- Supervivencia libre de enfermedad, calculada desde la fecha de diagnóstico a la fecha de evidencia de primera recaída local o a distancia.

- Tratamientos administrados después de la recaída, con evaluación de la respuesta a los mismos, y fechas de progresión.

En el seguimiento se evaluó a los pacientes cada tres meses durante los primeros dos años, después, en intervalos de seis meses durante tres años más y los siguientes años de forma anual. Las evaluaciones incluyeron examen físico, recuento hematológico, bioquímica sanguínea, con CEA y ecografía abdominal. Las radiografías de tórax y los TAC se solicitaron cada seis meses los dos primeros años y luego anuales durante cinco años. Se realizaron colonoscopias anuales. La confirmación histopatológica de la recaída se efectuó siempre que fue posible.

El grado de regresión tumoral al tratamiento se determinó con un examen de la pieza quirúrgica por un anatomopatólogo experto, evaluando la cantidad de células tumorales residuales y el grado de fibrosis, de acuerdo con el sistema propuesto por Rödel (145). 0/1 (no regresión o regresión menor del 25% de la masa tumoral); 2: regresión moderada (masa tumoral dominante con fibrosis del 26 al 50% de la lesión). 3: buena regresión (fibrosis dominante con más del 50%

de regresión tumoral) 4: regresión total, no células tumorales (pCR: *pathologic complete response*).

### 3.2. Genes

Para el análisis de expresión, se seleccionaron muestras con la mayor cantidad de células tumorales posible en la muestra post-

tratamiento, y del 75% al menos de células tumorales en la muestra de biopsia diagnóstica. Los genes se eligieron de acuerdo a un trabajo previo en el que se realizó una selección en dos pasos: en primer lugar un estudio de SAGE sobre tres pacientes (24 genes) y posteriormente una selección de genes de la literatura potencialmente importantes en este contexto (29 genes) (Tablas 8 y 9) (5).

Tabla 8 Genes seleccionados por SAGE

Gen	Unigene ID	Tag sequence	Descripción
ANGPTL4	Hs.9613	GTGCTGGTGC	Angiopoietin-like 4
BAT1	Hs.254042	TGTCTGTGGT	HLA-B associated transcript 1
CCNB1IP1	Hs.107003	CCACTGCACT	Cyclin B1 interacting protein 1
CHC1	Hs.469723	ATCTTGCTCA	Chromosome condensation 1
CKB	Hs.173724	CACCCCTGAT	Creatine kinase, brain
COL1A1	Hs.172928	TGGAAATGAC	Collagen, type I, alpha 1
EEF2	Hs.515070	AGCACCTCCA	Eukaryotic translation elongation factor 2
FXD3	Hs.301350	GCAGGGCCTC	FXD domain containing ion transport regulator 3
GPX2	Hs.2704	GGTGGTGTCT	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
GSTP1	Hs.523836	AGGTCCTAGC	Glutathione S-transferase pi
HIG2	Hs.710088	TGGCTTAAAT	Hypoxia-inducible protein 2
HLA-C	Hs.449621	GTGCGCTGAG	Major histocompatibility complex, class I, C
ITGB4	Hs.632226	AAGGGGGCAA	Integrin, beta 4
K-ALPHA-1	Hs.705373	TGTACCTGTA	Tubulin, alpha, ubiquitous
MMP14	Hs.2399	GGACCCCCAG	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
PCYT2	Hs.645248	GCTGACGGAA	Phosphate cytidylyltransferase 2, ethanolamine
PH-4	Hs.654944	TTATTTATTG	Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase
S100A10	Hs.143873	AGCAGATCAG	S100 calcium binding protein A10
SELENBP1	Hs.632460	AGCTCTTGGA	Selenium binding protein 1
SPARC	Hs.111779	ATGTGAAGAG	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)

<b>TFF3</b>	Hs.82961	CTCCACCCGA	Trefoil factor 3 (intestinal)
<b>WARS</b>	Hs.497599	TGCAGGCCTG	Tryptophanyl-tRNA synthetase
<b>XIST</b>	Hs.529901	GGTGACCACC	X (inactive)-specific transcript
<b>ZYX</b>	Hs.490415	CTGCCAAGTT	Zyxin

Tabla 9 Genes seleccionados de la literatura

Gen	Unigene	Function	Papel potencial en el estudio	Descripción
<b>ABCB4</b>	Hs.654403	Multidrug resistance	Respuesta a quimioterapia	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4
<b>AKT1</b>	Hs.525622	Cell Survival	Colon cancer cell invasion	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
<b>ALDH1A1</b>	Hs.76392	Aldehyde metabolism	Respuesta a quimioterapia	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
<b>ALDH3A1</b>	Hs.531682	Aldehyde metabolism	Respuesta a quimioterapia	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1
<b>AURKB</b>	Hs.442658	Chromosomal segregation during mitosis	Inestabilidad cromosómica	Aurora kinase B
<b>BAK1</b>	Hs.485139	Apoptosis promotion	Respuesta a quimioterapia	BCL2-antagonist/killer 1
<b>BCL2</b>	Hs.150749	Apoptosis promotion	Respuesta a quimioterapia	B-cell CLL/lymphoma 2
<b>BIRC5</b>	Hs.514527	Apoptosis Inhibition	Respuesta a quimioterapia	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
<b>CDKN1A</b>	Hs.370771	Regulator of cell cycle progression at G1	Respuesta a 5FU	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
<b>CDKN1B</b>	Hs.238990	Regulator of cell cycle progression at G1	Respuesta a Neoadyuvancia en Cáncer de Recto	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
<b>CHKA</b>	Hs.569019	Phospholipid metabolism	New oncogene	Choline kinase alpha isoform a
<b>EGFR</b>	Hs.488293	Cell growth	Respuesta a Neoadyuvancia en Cáncer de Recto	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)
<b>ERCC1</b>	Hs.435981	DNA repair mechanism	Respuesta a quimioterapia	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)
<b>ERCC2</b>	Hs.487294	DNA repair mechanism	Respuesta a quimioterapia	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D)
<b>FOS</b>	Hs.25647	Mediator of EGF pathway signaling, cell growth	Respuesta a quimioterapia	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
<b>FRAP1</b>	Hs.338207	Cell growth	Respuesta a quimioterapia	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1
<b>KDR</b>	Hs.479756	Angiogenic factor	Invasión celular en cáncer de colon	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)

<b>LGALS4</b>	Hs.5302	Cell adhesion	Invasión celular en cáncer de colon	Lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectin 4)
<b>MAPK14</b>	Hs.588289	Cellular response to stress	Respuesta a quimioterapia	Mitogen-activated protein kinase 14
<b>MAPK9</b>	Hs.654461	Cellular response to stress	Respuesta a quimioterapia	Mitogen-activated protein kinase 9
<b>MKI67</b>	Hs.80976	Proliferation marker	Factor Prognostico	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
<b>MLH1</b>	Hs.195364	Mismatch repair	Respuesta a 5FU	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
<b>PIK3R1</b>	Hs.132225	Cell Survival	Invasión celular en cáncer de colon	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)
<b>RELB</b>	Hs.654402	NF-KB subunit	Respuesta a 5FU	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
<b>SMAD2</b>	Hs.12253	Mediator of TGF beta signaling	Invasión celular en cáncer de colon	SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)
<b>STAT3</b>	Hs.463059	Cell Survival	Invasión celular en cáncer de colon	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
<b>TP53</b>	Hs.654481	Genome integrity gatekeeper	Respuesta a 5FU	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
<b>TYMP</b>	Hs.592212	Angiogenic factor	Respuesta a 5FU	Thymidine phosphorylase
<b>TYMS</b>	Hs.592338	FU metabolism	Respuesta a 5FU	Thymidylate synthetase

### 3.3. Procesamientos de las muestras

El procesamiento de las muestras se realizó siguiendo una serie de pasos que se describen a continuación: aislamiento del ARN total, síntesis del ADNc, y medida de la expresión génica mediante PCR cuantitativa.

#### 3.3.1 Aislamiento del ARN total

Para la extracción de RNA se partió de 5 a 10 secciones (según el tamaño del bloque) de tejido parafinado de 5 µm de grosor. Se siguió el protocolo descrito por Cronin et al. que consiste en un primer proceso de desparafinación y rehidratación del tejido mediante tratamiento con xilol y lavado con alcoholes de grado decreciente, comenzando con alcohol 100% hasta 70%. Tras ello, se digiere el tejido mediante un tratamiento con proteinasa K. A continuación, se digiere con DNasa I para eliminar el DNA. Y se precipita el RNA con isopropanol. Todo este proceso se realiza con la ayuda de los reactivos del kit Masterpure RNA

purification (Epicentre). La concentración y pureza del ARN total aislado se determinó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. La calidad de los distintos ARN fue también evaluada a través de electroforesis en geles de agarosa al 1%.

#### 3.3.2 Síntesis del ADN complementario

Para poder llevar a cabo la reacción de amplificación es preciso sintetizar el ADNc correspondiente al ARN total aislado. En la síntesis de ADNc se utilizó el kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems), que permite convertir cuantitativamente desde 0,1 mg hasta 10 mg de ARN en ADNc, en un volumen de 50mL.

En nuestro estudio decidimos abordar la síntesis de ADNc a partir de 200 ng de ARN total de cada una de las muestras. La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit, y empleando hexámeros al

azar como cebadores. Se empleó el siguiente programa:

- 1º: 10 minutos a temperatura de 25°C
- 2º: 120 minutos a temperatura de 37°C

### 3.3.3. Reacción de PCR cuantitativa

La reacción de PCR cuantitativa (qPCR) consigue en las distintas muestras una amplificación de la cantidad de ADNc correspondiente a cada uno de los genes, obteniéndose durante la misma un incremento progresivo de la señal fluorescente, que permitirá la cuantificación del ADNc (como se explicó en la introducción). Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) perteneciente al Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid. Las amplificaciones se realizaron por triplicado, con los ensayos específicos prediseñados para cada gen, y como soporte se utilizaron las tarjetas microfluídicas (Taqman Low Density Arrays) diseñadas por Applied Biosystems. Cada uno de los puertos de la tarjeta contenía 50 µL de Taqman Universal PCR Master Mix y 50 µL del ADNc correspondiente (cantidad equivalente a 100 ng del ARN total, que fue la misma para todas las muestras).

La expresión de cada gen expresada por el valor “Ct” (ciclo de amplificación requerido para alcanzar un umbral mínimo establecido) se midió por triplicado y se normalizó relativo a la media de tres genes *housekeeping* (GAPDH, B2M y PMSB4) medidos en toda la muestra mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$ :

$$\text{Dif expresión} = 2^{-(\text{Ct gen de interés} - \text{Ct genes housekeeping})}$$

### 3.3.4 Inmunohistoquímica

Se realizó inmunotinción en las piezas quirúrgicas (post-tratamiento). De las 116 muestras disponibles, se obtuvo un resultado

óptimo valorable en 82 casos. Para esto, se obtuvieron secciones de 4 µm de espesor recogidas en portas con carga electrostática a partir de los bloques de tejidos postratamiento. Los cortes obtenidos se secaron en estufa a 55°C toda la noche y posteriormente se desparafinaron con xilol y se deshidrataron con alcoholes de grado descendente. Tras ello, los cortes se secaron y se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena del tejido con una solución de peróxido de hidrógeno en metanol al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, los cortes fueron rehidratados y tratados para el desenmascaramiento. El desenmascaramiento se realizó sumergiendo los cortes en una solución de EDTA 1 mM con un pH de 8.2 durante 45 minutos en una estufa a 155°C. Tras este tratamiento, los cristales se atemperaron, se lavaron y se prepararon para la incubación durante 30 minutos con el anticuerpo monoclonal anti-TFF3 (H00007033-M01; *Novus Biologicals, Littleton, CO*) diluido a 1:250 en una solución de suero bovino con albúmina al 1% en solución salina tamponada TBS. Seguidamente los cortes se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa del sistema EnVision+ Dual Link de la casa comercial Dako. La incubación se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El revelado se realizó utilizando diaminobencidina, sustrato de la peroxidasa, durante 5 minutos, produciéndose un precipitado de color marrón. Las secciones se contratiñeron posteriormente con hematoxilina, se montaron con un cubreobjetos y se estudiaron utilizando un microscopio óptico. La inmunotinción se valoró de la siguiente manera:

- Positivo: presencia de inmunotinción en la luz de las microglándulas del tumor.
- Negativo: ausencia de inmunotinción en la luz de las microglándulas del tumor.



### 3.4. *In vitro*

#### 3.4.1 Cultivos celulares y transfección del vector de TFF3

Se utilizaron 10 líneas celulares de CCR: HT-29, SW480, SW620, T84, DLD-1, RKO, WiDr, COLO201, LoVo y HCT116 mediante el ATCC (*Global Bioresource Center*, Manassas, VA). Los medios de cultivo celular fueron: HT-29, SW480, SW620, T84, DLD-1 y RKO en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM); WiDr en Earle's minimal essential medium (EMEM); COLO 201 en RPMI; LoVo en Ham's F12K medium; y HCT116 en McCoy's 5A medium. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (todos los reactivos se obtuvieron de Gibco-BRL Life Technologies, Paisley, UK). Las células se cultivaron a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para la transfección estable de TFF3, las células DLD-1 se ubicaron en platos de 6 pocillos con 60-70% de confluencia. La cantidad de plásmido de DNA pCMV-neo-TFF3 (Origene Technology Rockville, MD, USA) se mantuvo constante a 3 microgramos por plato con el correspondiente vector vacío. Tras la transfección, las células se mantuvieron durante 24 horas en medio fresco, antes de su selección en medio con neomicina (2,5 mg/mL) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) donde se mantuvieron 12 días.

La expresión de TFF3 se analizó mediante qPCR siguiendo el mismo método descrito anteriormente. La normalización se realizó con 18S rRNA.

Los estudios de proliferación celular se hicieron mediante el método MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromuro). Se plantaron 8.000 células por pocillo en platos de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas bajo condiciones estándar. Se expusieron las células a

concentraciones crecientes de 5FU durante 72 horas (Sigma Chemical Co.). La reconstrucción del fármaco se realizó con PBS a 5nM. La absorbancia fue leída a 560 nm en un VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La absorbancia de cada plato se ajustó por la mediana de absorbancia de los platos vacíos. La sensibilidad de las células al 5FU fue evaluada por su Concentración Inhibitoria 50 (CI50), determinada por la concentración de droga necesaria para inhibir el crecimiento celular un 50% comparándolo con las células no tratadas.

#### 3.4.2 Extracción de RNA e hibridación de microarrays.

El RNA fue extraído de la línea parental DLD-1 transefectada con TFF3 usando reactivos TRizol (Invitrogen) y columnas Quiagen RNeasy (QIAGEN, Hilden, Germany) según las instrucciones del fabricante. El RNA se conjugó con fluoróforos Cy3 y Cy5G (E Healthcare Biosciences, Baie d'Urfe', Quebec, Canadá). La concentración de RNA y la incorporación del tinte se midieron con un espectrofotómetro UV-VIS (Nanodrop ND-1000; Agilent Technologies, Wilmington, DE). Se utilizaron microchips de expresión genómica completa con capacidad de detección de 44.000 transcritos (Agilent Technologies). Los chips de microarray fueron analizados con DNA Microarray Scanner (Model G2565BA, Agilent Technologies).

El análisis estadístico se realizó con el software FIESTA:

<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA/index.php>

El análisis Gene Ontology se realizó con el software Gene Set Enrichment Analysis (GSEA):

<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>

(303, 304) y también el software de IPA Ingenuity (<http://www.ingenuity.com>). Se utilizó el test exacto de Fischer para detectar clases que estuvieran enriquecidas en genes discriminantes. Se utilizó como nivel de significación estadística

$p < 0,01$  para diferenciar los niveles de expresión génica.

### 3.5. Estadística

#### Estadística descriptiva.

Para resumir los datos de las diferentes variables se calcularon los estadísticos correspondientes en función del tipo de variable. En el caso de variables cualitativas se calcularon las frecuencias absolutas de cada modalidad de la variable y las frecuencias relativas expresadas en porcentajes. En las variables cuantitativas se calcularon las medidas de tendencia central media o mediana. Como medidas de dispersión se utilizó la desviación típica y el recorrido de la variable.

#### Estadística inferencial

En las variables cualitativas se aplicó el test de chi al cuadrado con la corrección de Yate y en el caso de tablas de 2x2 la prueba exacta de Fisher. Antes de proceder a la aplicación de test de hipótesis para variables cuantitativas se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS) para estudiar el tipo de distribución que seguía la variable (normal, no normal). En las variables donde la prueba KS indicara que seguía una distribución normal se aplicaron pruebas paramétricas (t de Student) y en caso contrario test no paramétricos (Wilcoxon, U de Mann-Whitney). de los objetivos del estudio es la valoración del cambio en las expresiones de genes antes y después del tratamiento con quimioterapia, parte de las pruebas aplicadas se correspondían con pruebas para muestras pareadas o dependientes.

#### Normalización de Ct

Como paso previo al análisis de los datos procedentes de la qPCR se procedió a la normalización de los mismos. Se aplicó la normalización con los tres genes más estables

(GADPH, B2M, PMSB4) sobre toda la muestra de pacientes, la normalización se realizó con las medias de cada gen obtenidas del total de pacientes. Se utilizó el método delta aplicando una transformación logarítmica en base 2 a cada intensidad como se ha comentado anteriormente:

#### Análisis de cambios dinámicos de expresión pre/post-tratamiento

Con el objetivo de evaluar los cambios en la expresión génica después del tratamiento utilizamos el test de T para muestras pareadas.. Los genes con diferencias significativas en la expresión ( $p < 0,01$ ) se seleccionaron y su resultado fue dicotomizado para los análisis de supervivencia ( $>0$ : sobreexpresión,  $<0$ : infraexpresión). Se analizó la influencia de cada gen en la SLE mediante análisis de Cox univariante y multivariante ajustado por edad, estadio patológico y grado de regresión tumoral. La proporcionalidad del HR, en el modelo de Cox, se evaluó aplicando el modelo de Schoenfeld.

# RESULTADOS

---



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Datos clínicos

Se incluyeron 129 pacientes en el estudio. El resumen de las variables clínicas y patológicas pueden verse en la Tabla 10. El 25% de los pacientes no respondieron al tratamiento (TRG

0/1: N=32) mientras que el 10% obtuvo una respuesta completa (TRG 4: N=13). Tras una mediana de seguimiento de 41 meses (rango 5-127 meses), 34 pacientes desarrollaron metastasis a distancia (26%) y 11 pacientes una recaída local (9%). Hasta la fecha de finalización de seguimiento, 25 pacientes han fallecido (19%).

Tabla 10 Características Clínicas y patológicas

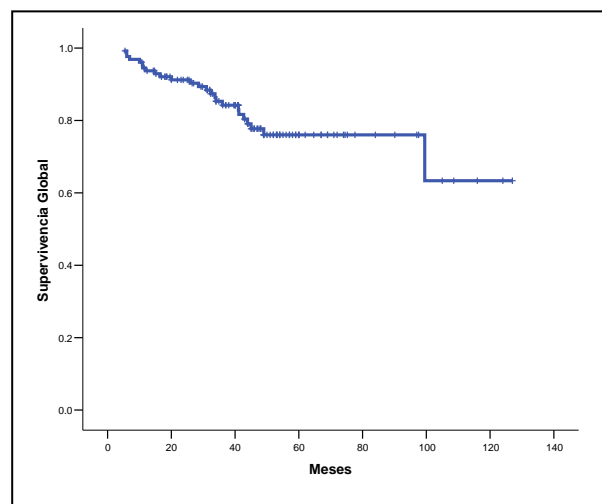
Característica	N	%
<b>Edad (mediana y rango)</b>	65	[23-84]
<b>Genero</b>		
Masculino	71	55
Femenino	58	45
<b>ECOG</b>		
0	78	61
1	48	37
2	3	2
<b>T clínica</b>		
2	13	10
3	79	61
4	11	9
Desc.	26	20
<b>N clínica</b>		
0	59	46
1/2	51	39
Desc.	19	15
<b>Estadio Clínico</b>		
I	9	7
II	65	50
III	51	39
Desc.	4	3
<b>T patológica</b>		
0	13	10
1	9	7
2	27	21
3	75	58
4	5	4
<b>N patológica</b>		
0	93	72
1/2	36	28
<b>Estadio patológico</b>		
0	13	10
I	32	25
II	48	37
III	36	28
<b>Mediana de CEA (rango) (ng/mL)</b>	3,4	(0,4-67,4)
<b>Mediana cm. del margen anal (rango)</b>	5	(0-15)

<b>Mediana Ganglios extirpados (rango)</b>	8	(0-27)
<b>Mediana plaquetas (rango) (/mm<sup>3</sup>)</b>	264.500	(27.000-1.066000)
<b>Cirugía</b>		
<b>Resección anterior baja</b>	71	55
<b>Amputación abdominoperineal</b>	54	42
<b>Resección local</b>	4	3
<b>Quimioterapia neoadyuvante</b>		
<b>Fluoropirimidina sola</b>	71	55
<b>Oxaliplatino + Fluoropirimidina</b>	58	45
<b>Quimioterapia adyuvante</b>		
<b>Sí</b>	105	81
<b>No</b>	24	19
<b>Grado de Regresión Tumoral</b>		
<b>0/1</b>	32	25
<b>2</b>	70	54
<b>3</b>	14	11
<b>4</b>	13	10

El 55% de los pacientes recibió quimioterapia basada en fluoropirimidinas: UFT (300 mg/m<sup>2</sup> días 1–14 con radioterapia y posteriormente 390 mg/m<sup>2</sup> cada 28 días) + leucovorin (LV) (250 mg/m<sup>2</sup> día 1 y 7.5 mg/m<sup>2</sup>/12 h días 2–14) (305); Capecitabina sola (825mg/m<sup>2</sup> cada 12 horas de forma continua durante la radioterapia y posteriormente días 1-14 en ciclos de 3 semanas a 2500mg/m<sup>2</sup>); 5FU 350 mg/m<sup>2</sup>+LV 20/mg/m<sup>2</sup> días 1-5. El resto (45%) recibió terapia en combinación con oxaliplatino: raltitrexed (3 mg/m<sup>2</sup>) + oxaliplatino (130 mg/m<sup>2</sup>) cada 3 semanas, o XELOX: capecitabina 2000 mg/m<sup>2</sup> días 1-14 + oxaliplatino (130 mg/m<sup>2</sup>) cada 3 semanas.

La supervivencia global (SG) a los 3 años fue de un 84% y a los 5 años de un 76% (Figura 16).

Figura 16 Supervivencia Global (todos los pacientes)



La supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 3 años fue del 65% con una SLE a los 5 años del 58% (Figura 17).

Figura 17 Supervivencia Libre de Enfermedad (todos los pacientes)

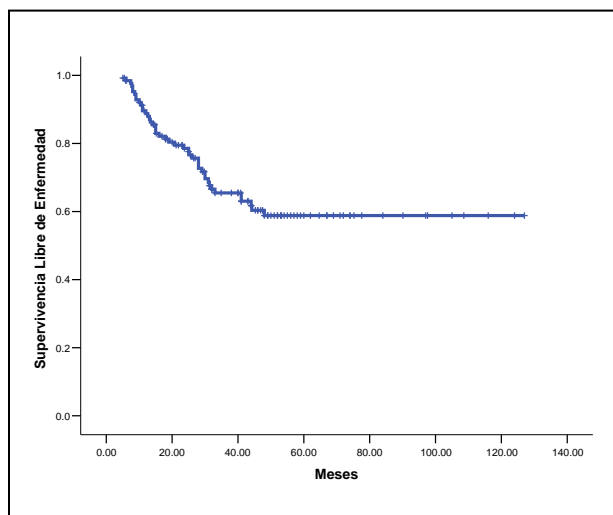
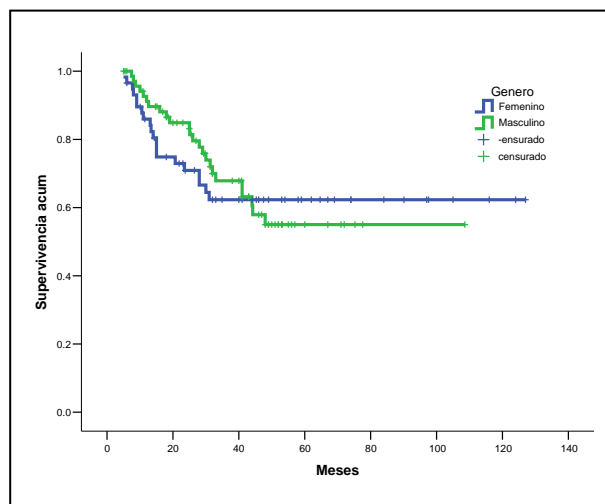


Figura 18 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del género



### Supervivencia en función de factores clínico-patológicos

*Análisis univariante:* En el análisis univariante ni el género (figuras 18 y 19) ni el estadio clínico (figuras 20 y 21) tuvieron influencia en los parámetros de supervivencia (SLE y SG). El estadio patológico, por el contrario, sí que condicionó tanto la SLE (figura 26) como la SG (figura 27) por la influencia de los factores que lo componen (ypT e ypN) ya que ambos fueron factores pronósticos importantes (figuras 22 a 25). También el CEA fue factor pronóstico para la SLE (figuras 28 y 29) tal y como sugerimos en un estudio previo (221), con el punto de corte en 2,5ng/mL.

El grado de regresión tumoral (TRG) no obtuvo diferencias estadísticamente significativas cuando se comparaban de forma individual, aunque como puede verse en la figura sí que tuvo impacto pronóstico al diferenciar claramente los grupos con buena respuesta (TRG 3) y respuesta completa (TRG 4) de los otros dos (TRG0/1 y 2) (figuras 30 y 31).

Figura 19 Supervivencia Global en función del género

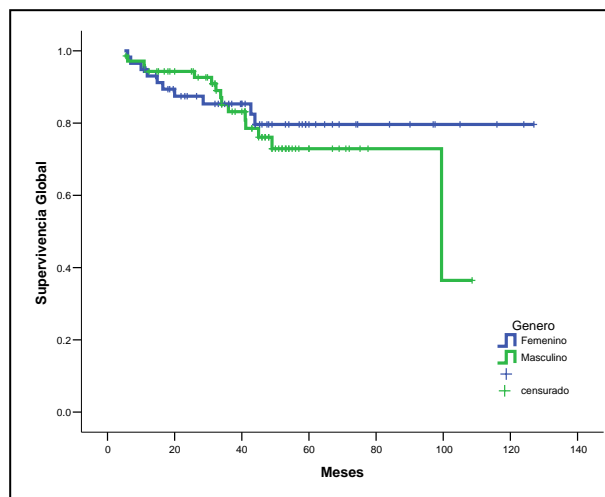


Figura 20 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del estadio clínico

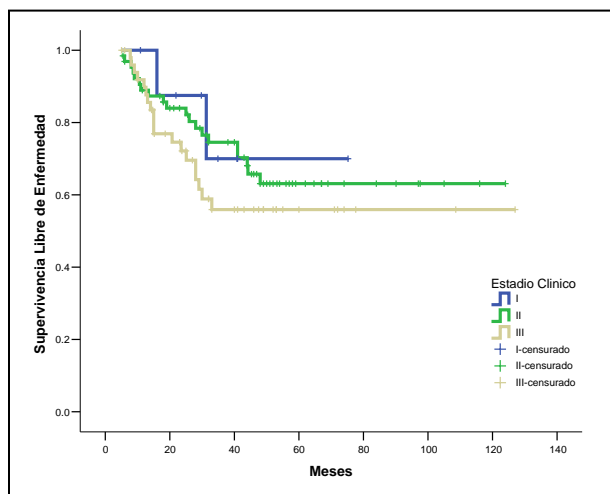


Figura 22 Supervivencia Libre de Enfermedad en función de ypT

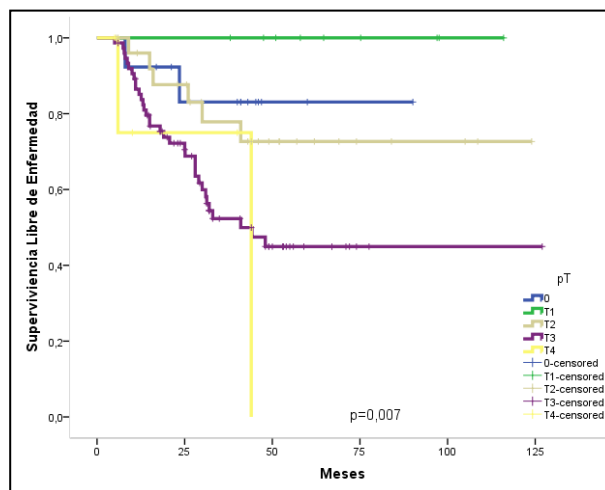


Figura 21 Supervivencia Global en función del estadio clínico

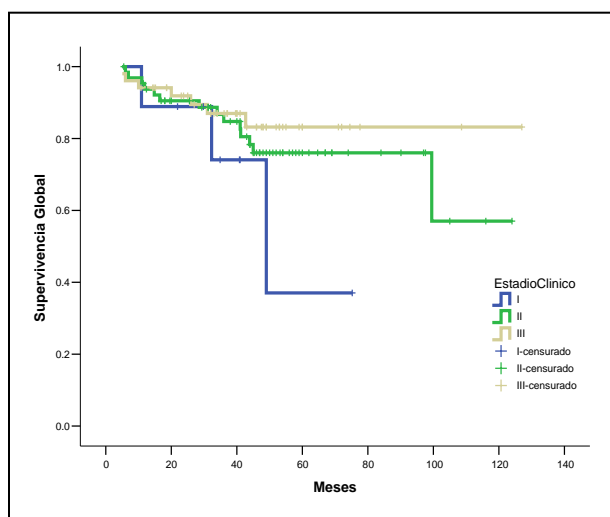


Figura 23 Supervivencia Global en función de ypT

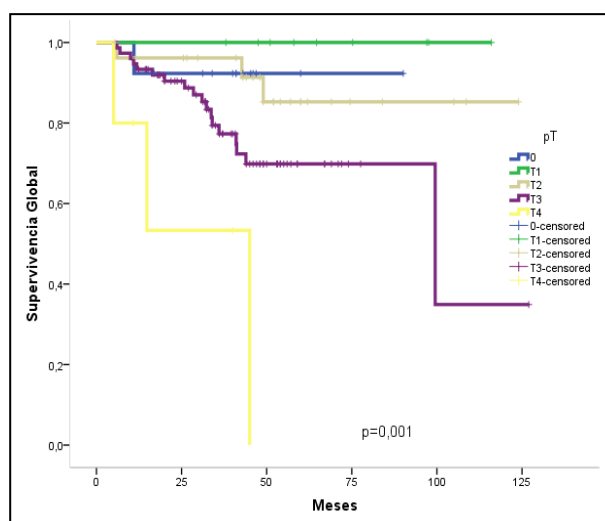




Figura 24 Supervivencia Libre de Enfermedad en función de ypN

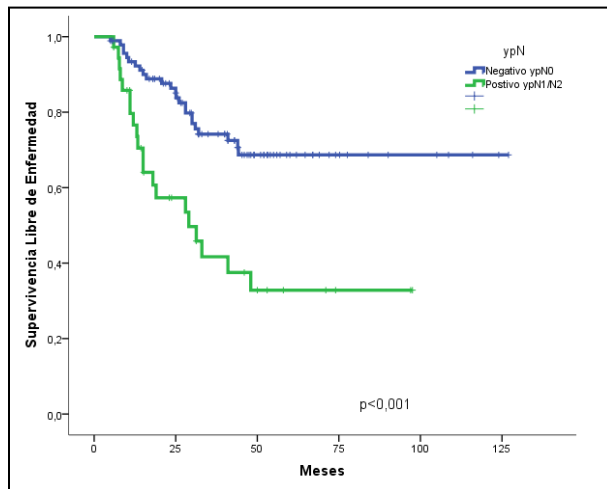


Figura 26 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del estadio patológico

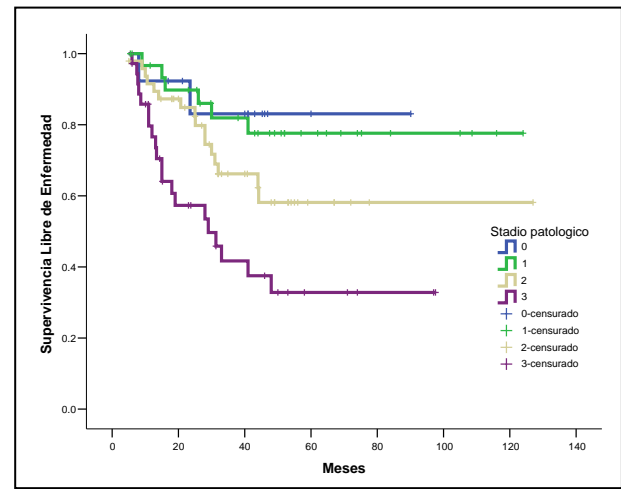


Figura 25 Supervivencia Global en función de ypN

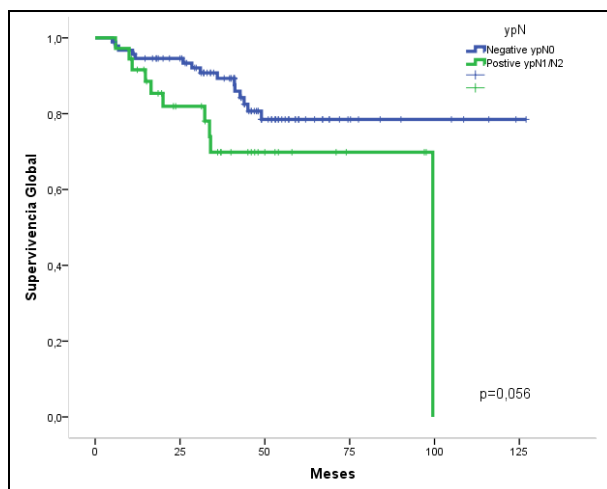


Figura 27 Supervivencia Global en función del estadio patológico

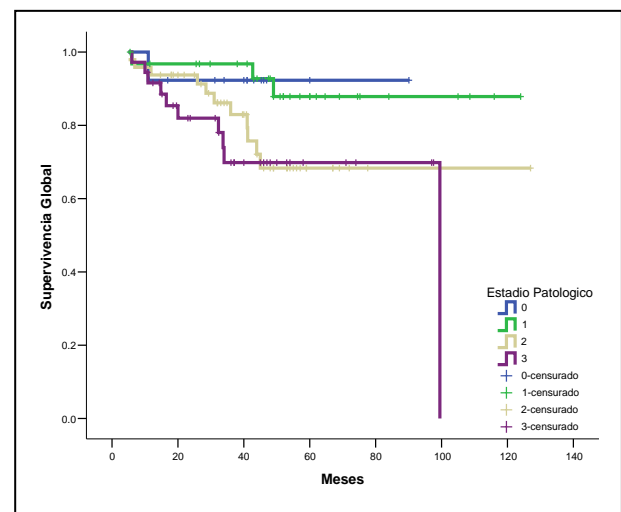


Figura 28 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del CEA sérico

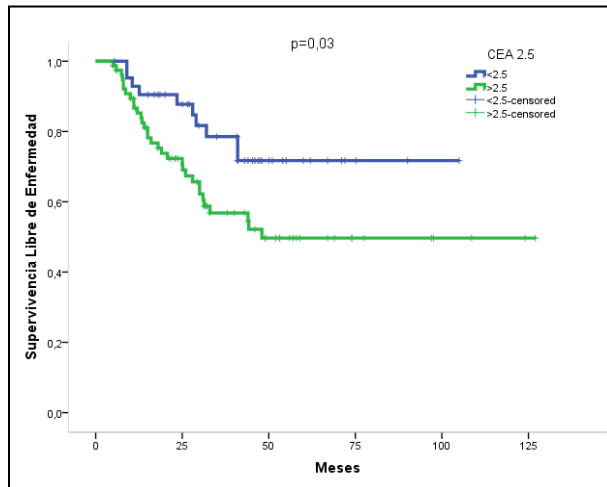


Figura 30 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del TRG

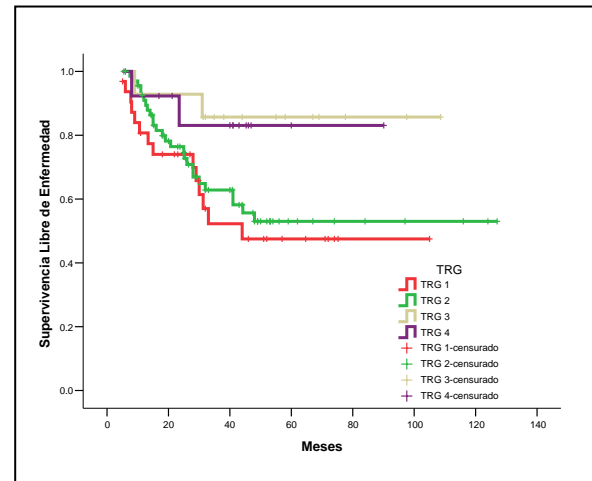


Figura 29 Supervivencia Global en función del CEA sérico

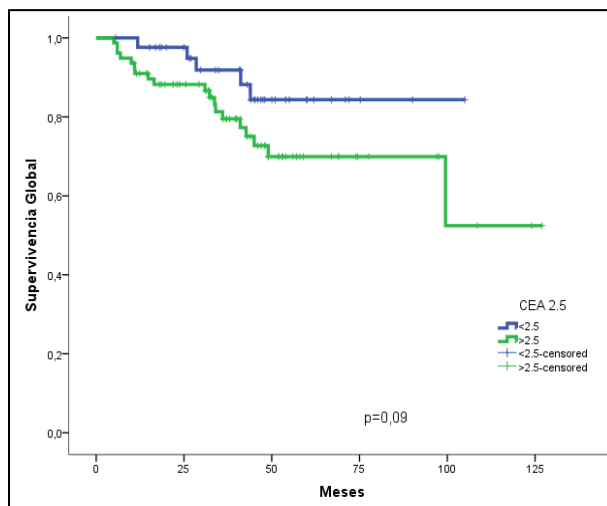
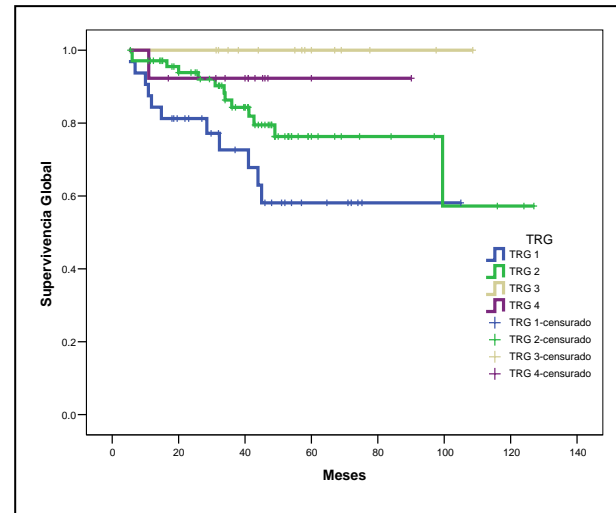


Figura 31 Supervivencia Global en función del TRG



**Análisis multivariante:** en análisis multivariante incluyendo los factores clínicos y patológicos se observó que el único factor que guardó relación con la SLE fue el estadio ganglionar con un HR de 0,43 (IC95%: 0,2-0,8) para la ausencia de afectación ganglionar (Tabla 11). Ningún factor resultó estadísticamente significativo en relación con la SG (Tabla 12).

**Tabla 11 Análisis multivariante para SLE en función de factores clínico-patológicos**

	HR	IC 95%		p
ypN (neg.)	,433	,21	,87	,02
ypT (aum)	1,580	,92	2,71	,09
E. clínico (aum)	1,260	,71	2,21	,42
EDAD (aum)	,997	,96	1,02	,86
SEXO (M)	,712	,36	1,39	,32
ECOG (aum)	1,375	,72	2,59	,32
CEA (aum)	,994	,95	1,03	,74
TRG (aum)	,818	,48	1,39	,46

E.: estadio. Aum.: aumento.

**Tabla 12 Análisis multivariante para SG en función de factores clínico-patológicos**

	HR	IC 95%		p
ypN	,76	,30	1,93	,57
ypT (aum)	1,96	,89	4,33	,09
E. clínico (aum)	,52	,24	1,13	,10
EDAD (aum)	1,01	,96	1,05	,64
SEXO (M)	1,06	,41	2,73	,89
ECOG (aum)	1,23	,52	2,88	,62
CEA (aum)	1,01	,97	1,04	,59
TRG (aum)	,59	,27	1,27	,18

E.: estadio

## 4.2 Cambios dinámicos en la expresión génica

En 74 pacientes se obtuvieron datos de expresión diferencial de los 53 genes antes y después del tratamiento. De éstos, se encontró que 24 genes habían modificado su expresión de forma significativa ( $p < 0,01$ ). En 22 de ellos la expresión había aumentado tras el tratamiento, mientras que en 2, había disminuido (Tabla 13) (Figura 32). Entre ellos se encontraban genes implicados en el control del ciclo celular, proliferación y apoptosis como *CCNB1IP1* (306), *RCC1* (307), *EEF2* (308), *CDKN1* (309) y *BCL-2*, control de radicales libres e hipoxia como *HIG-2* e incluso reguladores del proceso metastásico como *SPARC* (310).

## 4.3 Impacto pronóstico de los genes modificados por el tratamiento.

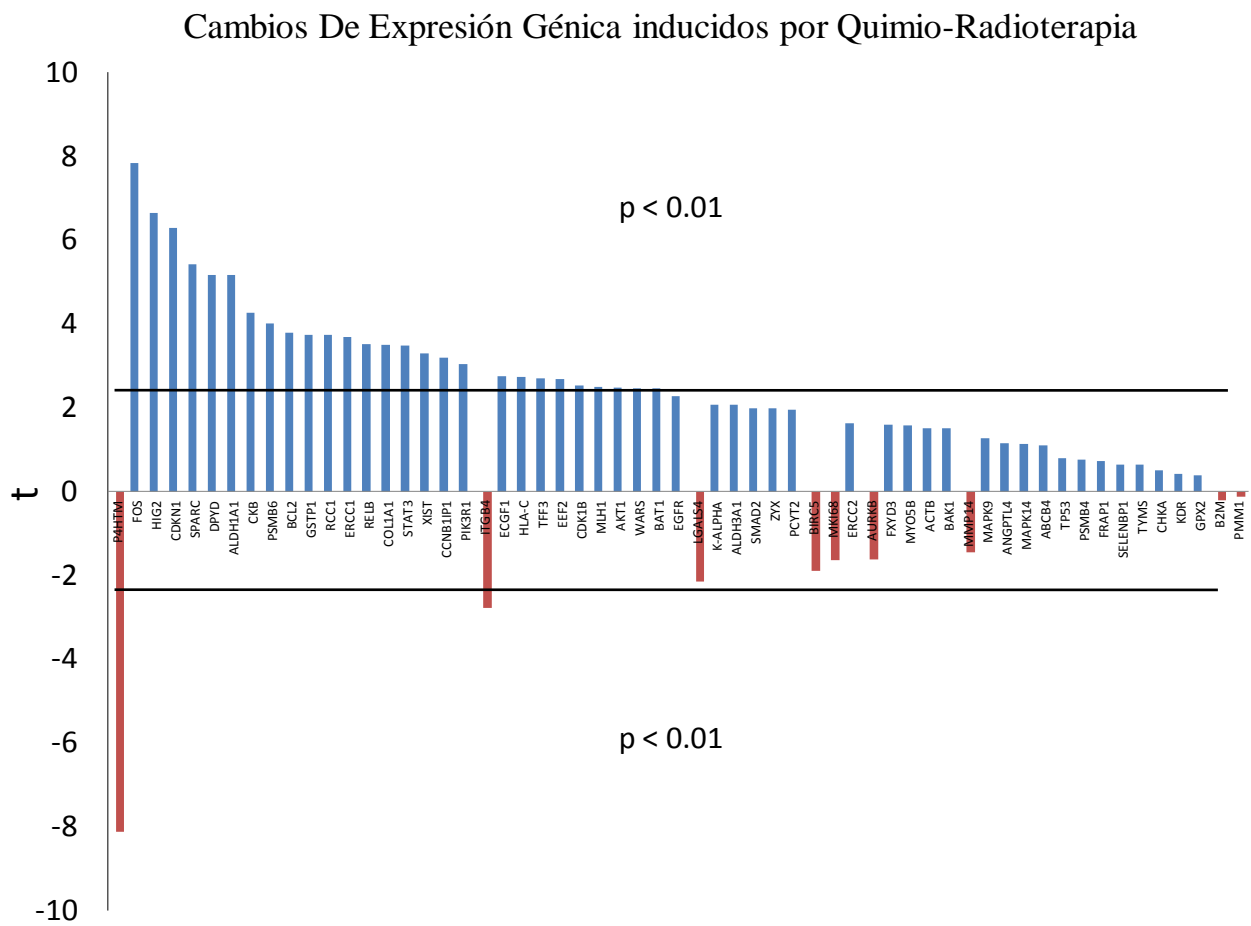
Se realizó un análisis univariante de supervivencia libre de enfermedad con los 24 genes que modificaban su expresión observándose que tan solo *TFF3* tenía relación con la SLE de forma significativa. Los pacientes en los que *TFF3* aumentaba tras el tratamiento (diferencia de expresión de mRNA > 0) tenían una peor SLE (HR: 2,56) ( $p = 0,019$ ) (Tabla 14) (Figura 33). Se observó también una peor SG para esos pacientes aunque no se alcanzó la significación estadística ( $p = 0,14$ ) dado el bajo número de eventos globales (Figura 34). La modificación de ningún otro gen demostró tener impacto pronóstico.

El análisis multivariante confirmó el impacto pronóstico independiente de este factor cuando se ajustó con las variables clínicas y patológicas habituales que habían mostrado impacto pronóstico (Tabla 16 - Modelo 1).

Tabla 13 Genes Modificados tras el tratamiento Químio-Radioterápico

Gene Symbol	Unigene	t test	p	Descripción
<b>Infraexpresados</b>				
<b>P4HTM</b>	Hs00214665	-8.129	8.8E-12	<i>Prolyl 4-hydroxylase</i>
<b>ITGB4</b>	Hs00173995	-2.787	0.006769	<i>Integrin <math>\beta</math>4</i>
<b>Sobreexpresados</b>				
<b>FOS</b>	Hs00170630	7.834	2.66E-11	<i>V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>HIG2</b>	Hs00203383	6.651	4.59E-09	<i>Hypoxia inducible gene 2 protein</i>
<b>CDKN1</b>	Hs00355782	6.282	2.07E-08	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
<b>SPARC</b>	Hs00234160	5.423	7.06E-07	<i>Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)</i>
<b>DPYD</b>	Hs00556278	5.170	1.92E-06	<i>Dihydropyrimidine dehydrogenase</i>
<b>ALDH1A1</b>	Hs00167445	5.166	1.95E-06	<i>Aldehyde dehydrogenase 1A1</i>
<b>CKB</b>	Hs00176484	4.264	5.93E-05	<i>Creatine kinase B</i>
<b>PSMB6</b>	Hs00382586	4.008	0.000146	<i>Proteasome subunit beta type 6</i>
<b>BCL2</b>	Hs00153350	3.788	0.000307	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
<b>GSTP1</b>	Hs00168310	3.738	0.000366	<i>Glutathione S-transferase pi 1</i>
<b>RCC1</b>	Hs00154399	3.732	0.000373	<i>Regulator of chromosome condensation</i>
<b>ERCC1</b>	Hs00157145	3.686	0.000431	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>
<b>RELB</b>	Hs00232399	3.511	0.000764	<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B</i>
<b>COL1A1</b>	Hs00164004	3.492	0.000817	<i>Collagen type 1, <math>\alpha</math>1</i>
<b>STAT3</b>	Hs00374280	3.476	0.000855	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
<b>XIST</b>	Hs00300535	3.299	0.0015	<i>X (inactive)-specific transcript (non-protein coding)</i>
<b>CCNB1IP1</b>	Hs00603841	3.189	0.002103	<i>Cyclin B1 interacting protein 1</i>
<b>PIK3R1</b>	Hs00236128	3.040	0.003266	<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)</i>
<b>TYMP</b>	Hs00157317	2.745	0.007583	<i>thymidine phosphorylase</i>
<b>HLA-C</b>	Hs00740298	2.723	0.00809	<i>Major histocompatibility complex, class I, C</i>
<b>TFF3</b>	Hs00173625	2.700	0.008609	<i>Trefoil factor 3 (intestinal)</i>
<b>EEF2</b>	Hs00157330	2.687	0.008919	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2</i>

Figura 32 Cambios de Expresión Génica tras el tratamiento Quimio-Radioterápico



**Tabla 14** Análisis Univariante de Supervivencia Libre de Enfermedad en relación con los genes que se modifican por el tratamiento

<b>Gene Symbol</b>	<b>HR (95%IC)</b>	<b>p</b>
<b>ALDH1A1</b>	1.79 (0.77-4.19)	0.175
<b>BCL2</b>	1.48 (0.64-3.44)	0.357
<b>CCNB1IP1</b>	2.19 (0.98-4.88)	0.055
<b>CDKN1</b>	0.98 (0.37-2.62)	0.976
<b>CKB</b>	1.91 (0.82-4.43)	0.134
<b>COL1A1</b>	0.81 (0.34-1.95)	0.644
<b>DPYD</b>	1.03 (0.41-2.59)	0.941
<b>EEF2</b>	1.34 (0.60-2.98)	0.478
<b>ERCC1</b>	1.57 (0.67-3.63)	0.296
<b>FOS</b>	1.06 (0.32-3.56)	0.917
<b>GSTP1</b>	1.37 (0.60-2.92)	0.484
<b>HIG2</b>	1.44 (0.57-3.60)	0.441
<b>HLA-C</b>	1.30 (0.58-2.89)	0.524
<b>ITGB4</b>	1.96 (0.86-4.44)	0.107
<b>P4HTM</b>	0.90 (0.38-2.18)	0.825
<b>PIK3R1</b>	1.95 (0.89-4.29)	0.096
<b>PSMB6</b>	1.42 (0.61-3.28)	0.418
<b>RCC1</b>	1.48 (0.65-3.36)	0.345
<b>RELB</b>	1.02 (0.44-2.37)	0.960
<b>SPARC</b>	1.13 (0.42-3.02)	0.805
<b>STAT3</b>	0.99 (0.43-2.31)	0.991
<b>TFF3*</b>	2.56 (1.17-5.64)	0.019
<b>TYMP</b>	0.99 (0.43-2.32)	0.998
<b>XIST</b>	1.27 (0.55-2.94)	0.578

\* Estadísticamente significativo

Figura 33 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del cambio de expresión de TFF3

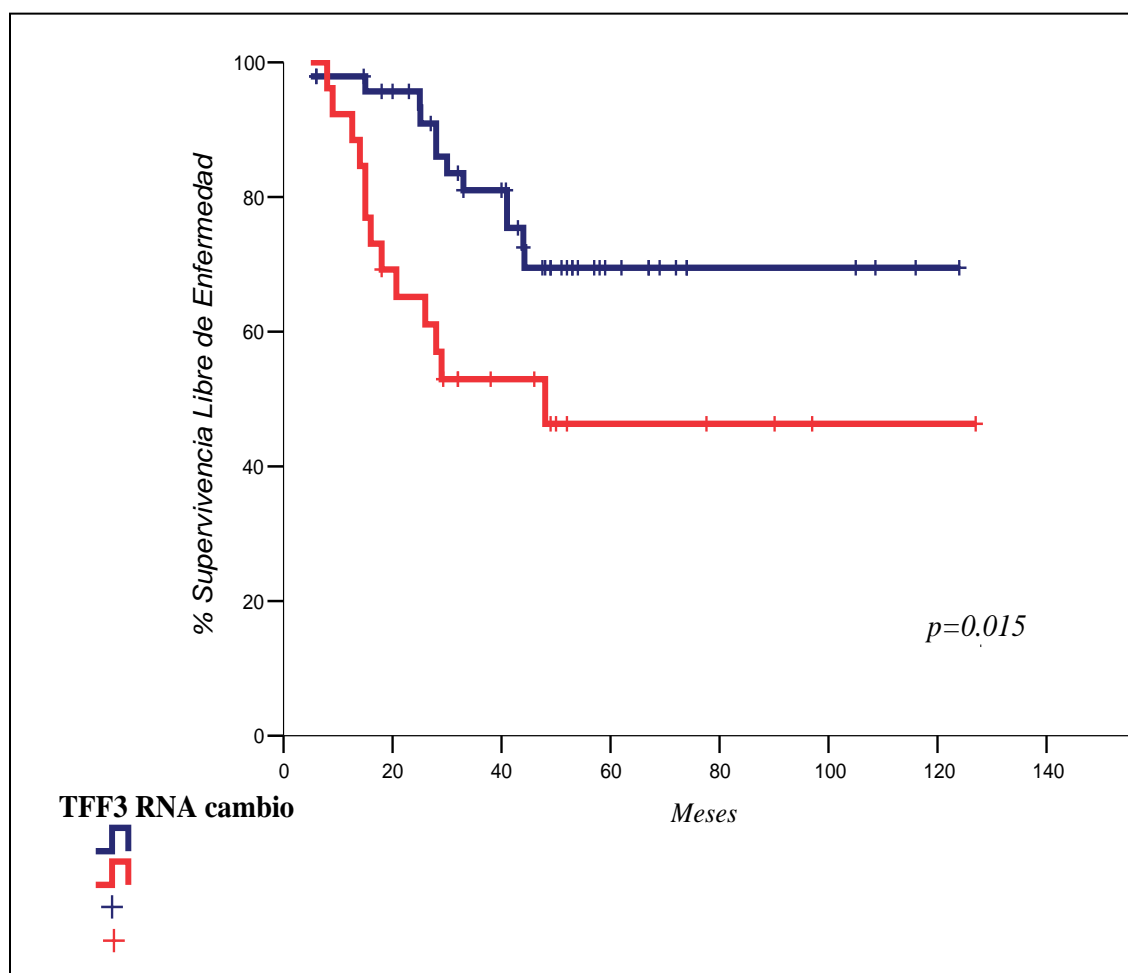
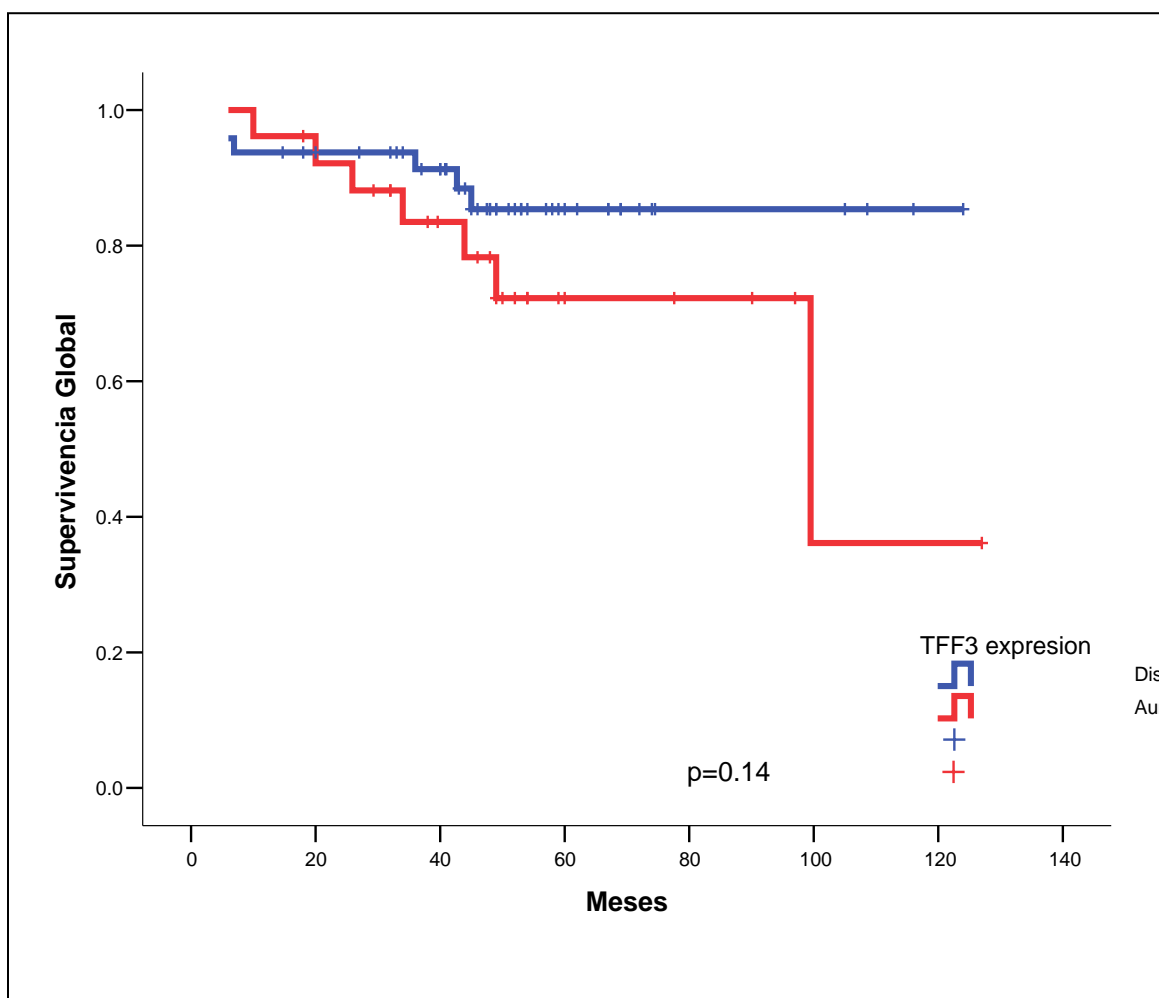


Figura 34 Supervivencia Global en función del cambio de expresión de TFF3



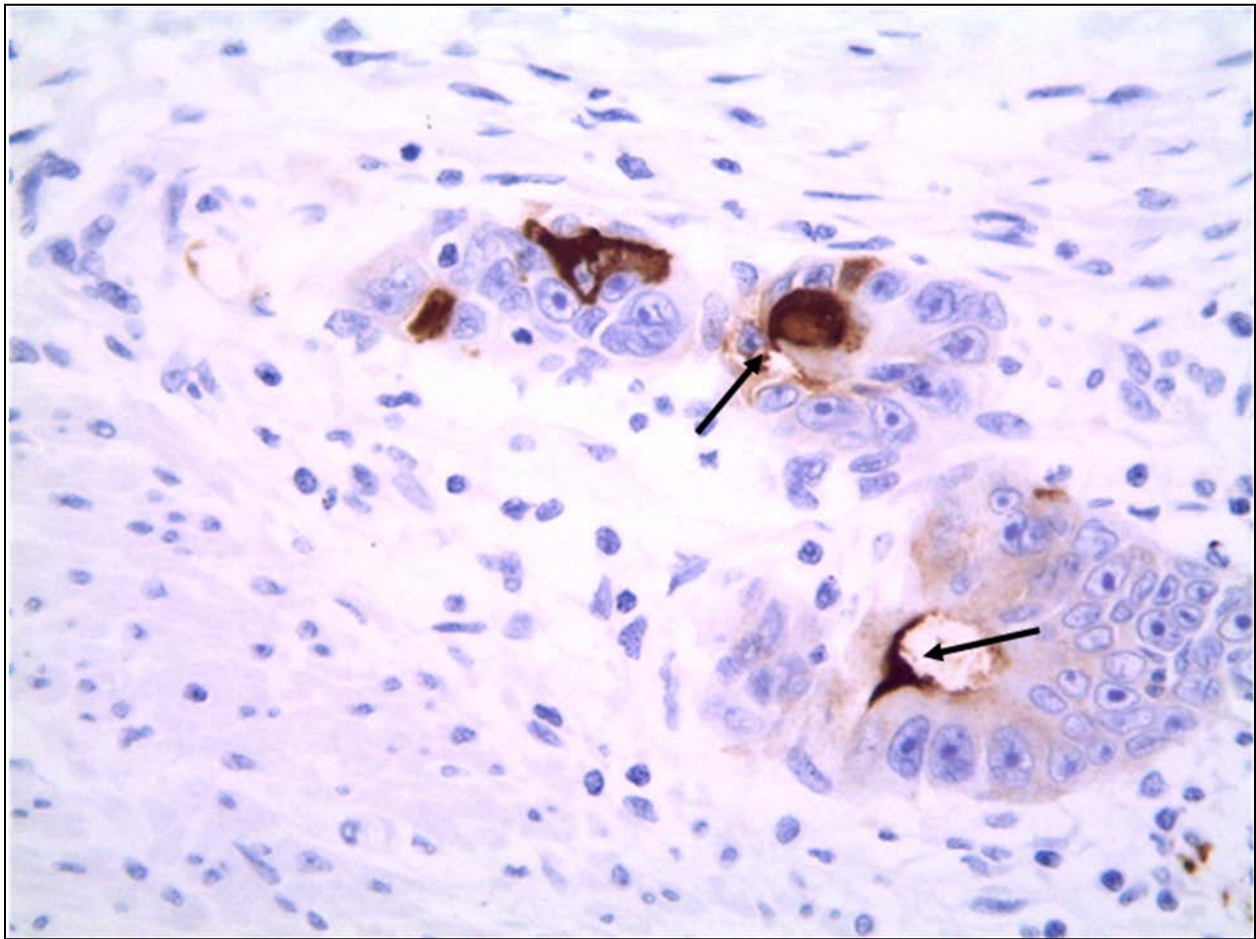
#### 4.4 Análisis inmunohistoquímico de TFF3

Dado que la sobreexpresión génica de TFF3 se asociaba a un peor pronóstico, se estudió si éste impacto era similar para la expresión proteica. Se realizó IHQ en 82 muestras post-tratamiento disponibles. Se observó en 28 casos (34%) una característica secreción de la proteína en la luz

de la glándula tumoral (Figura 35). Se observó que los casos positivos también tenían una peor SLE y SG tanto en el análisis univariante como en el multivariante ( $p < 0,01$  para ambos) (Tablas 15 y 16 - Modelo 2) (Figuras 36 y 37).



Figura 35 Tinción Inmunohistoquímica de TFF3



Se observa la clásica secreción intraluminal y en la membrana apical de la célula tumoral.

Figura 36 Supervivencia Libre de Enfermedad según expresión de TFF3 por inmunohistoquímica

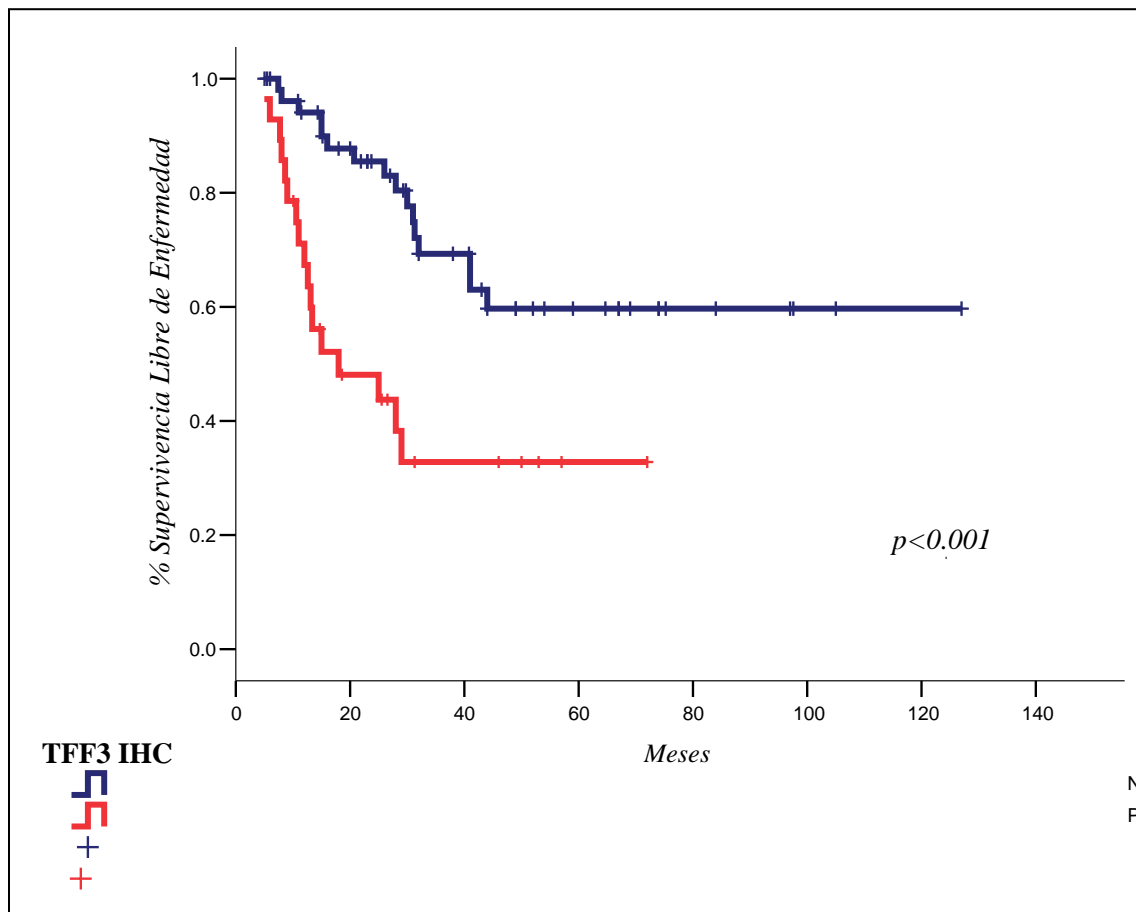


Figura 37 Supervivencia Global según expresión de TFF3 por inmunohistoquímica

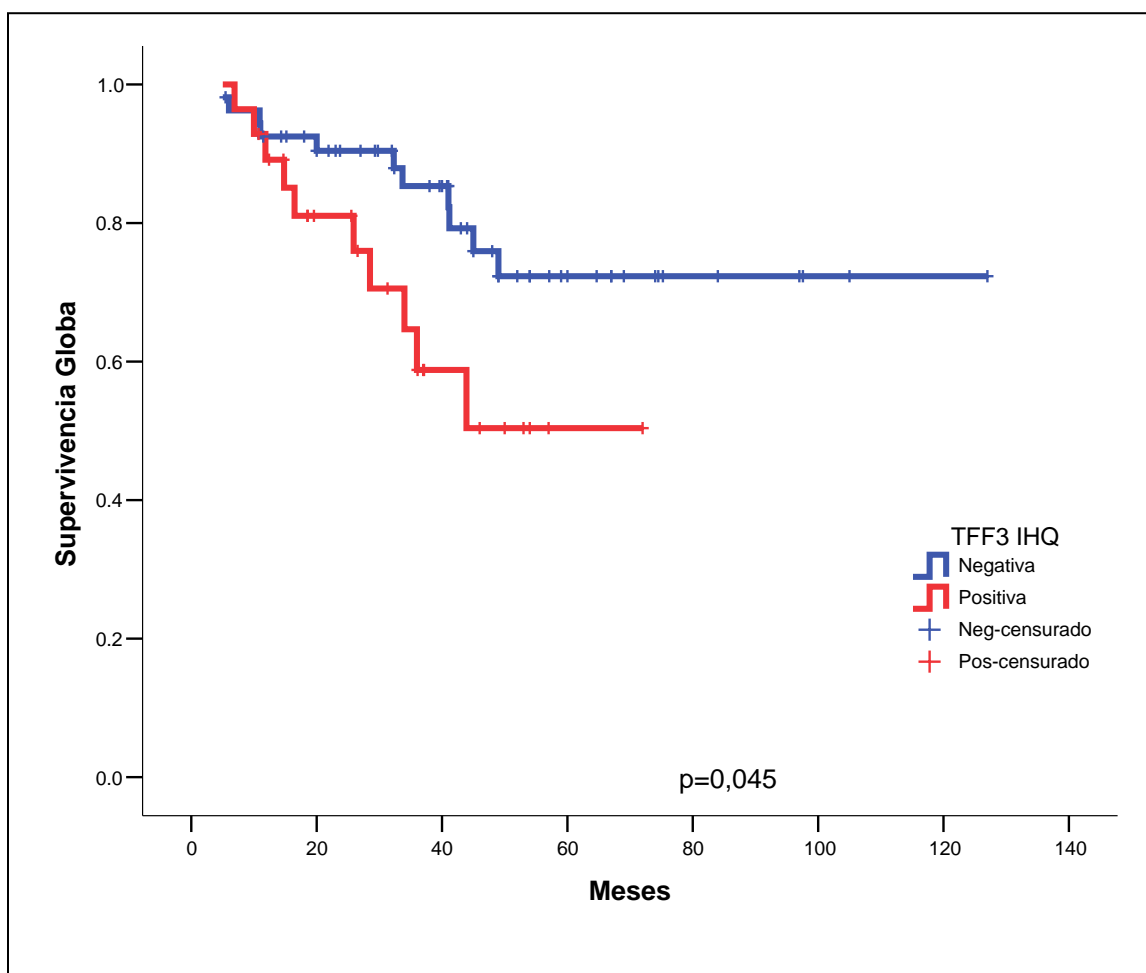


Tabla 15 Análisis Univariante de Supervivencia

<b>Factor</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>% SLE a los 3 años- [95% IC]</b>	<b>P</b>	<b>% SG a los 3 años [95% IC]</b>	<b>P</b>
Todos	129	65 [56-74]		85 [79-92]	
Género			0.85		0.55
Masculino	71	68 [56-80]		85 [76-94]	
Femenino	58	62 [49-75]		85 [76-94]	
AJCC TNM estadio patológico			<0.01		0.06
0	13	83 [61-100]		92 [78-100]	
1	32	82 [67-96]		97 [86-100]	
2	48	66 [51-81]		86 [76-96]	
3	36	42 [24-60]		70 [53-86]	
Grado de Regresión Tumoral			0.07		0.02
0/1	32	52 [33-71]		72 [56-89]	
2	70	63 [50-75]		86 [77-95]	
3	14	86 [67-100]		100 [-]	
4	13	83 [62-100]		92 [78-100]	
TFF3 PCR			0.01		0.15
≤0	48	81 [69-93]		94 [87-100]	
>0	26	53 [34-72]		83 [68-98]	
TFF3 IHQ			<0.01		0.04
Negativa	54	69 [55-83]		85 [75-95]	
Positiva	28	33 [13-52]		65 [44-85]	

IC: Intervalo de Confianza.

Tabla 16 Análisis Multivariante de Supervivencia Libre de Enfermedad

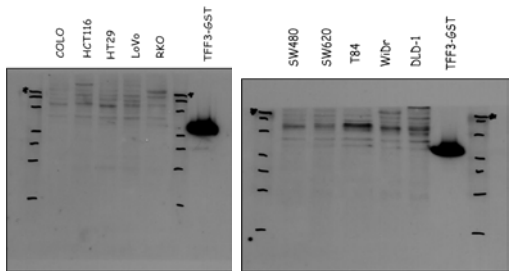
Variable	Modelo 1		Modelo 2	
	HR	P-value	HR	P-value
Edad (aumento)	1	0.89	1	0.57
Estadio Patológico (aumento)	1.27	0.41	1.61	0.06
TRG (aumento)	0.59	0.13	0.9	0.69
TFF3 RNA sobre-expresión	2.64	0.027	-	-
TFF3 IHQ (positivo)	-	-	2.51	0.014

Modelo 1: incluyendo la expresión de TFF3. Modelo 2: incluyendo inmunohistoquímica de TFF3.

4.5 Estudio de sensibilidad *in vitro* de células transfectadas con TFF3

Para determinar la importancia biológica de TFF3 en la célula del CCR se analizó la presencia de TFF3 en 10 líneas celulares: COLO201, HCT116, HT-29, LoVo, RKO, SW480, SW620, T84, WiDr, y DLD-1. En ninguna se pudo demostrar la expresión de TFF3 basal ni por qPCR ni por inmunoblot (Figura 38).

Figura 38 Western-Blot de líneas de CCR humano. Control de TFF3



La adición de diferentes concentraciones de 5FU no produjo estímulo para la expresión de TFF3 ni a las 24h ni a las 48 horas (Figuras 39, 40 y 41).

Figura 39 Cambios en la expresión de RNA de TFF3 por 5FU en líneas celulares de CCR humano

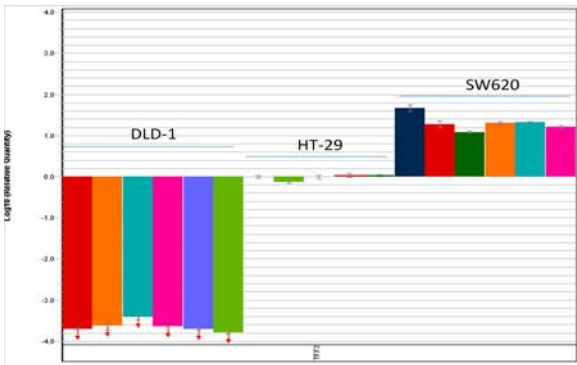
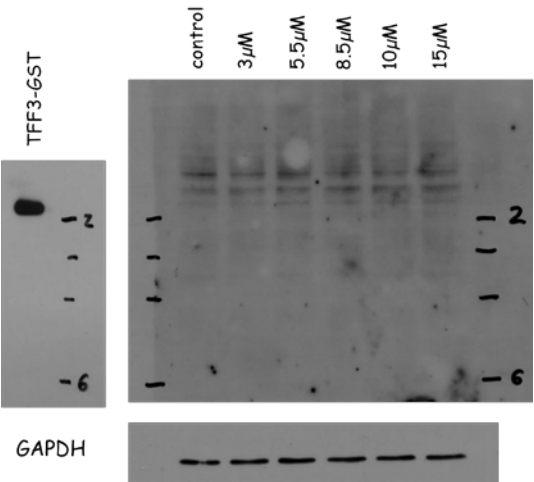
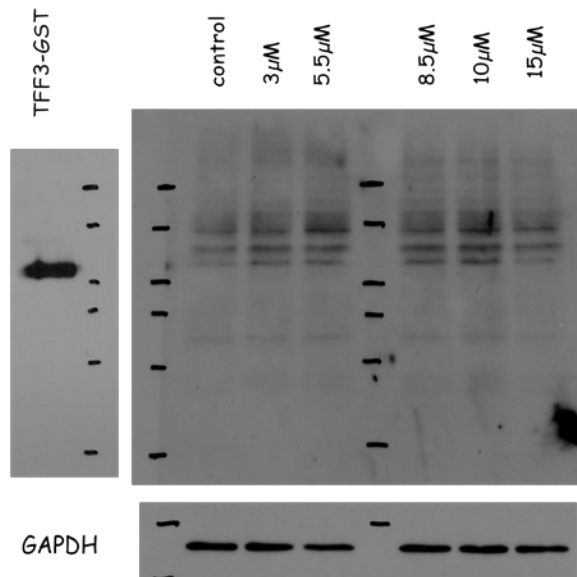


Figura 40 Western-Blot de líneas de CCR humano. 24 horas tras la adición de 5FU (60 µg)

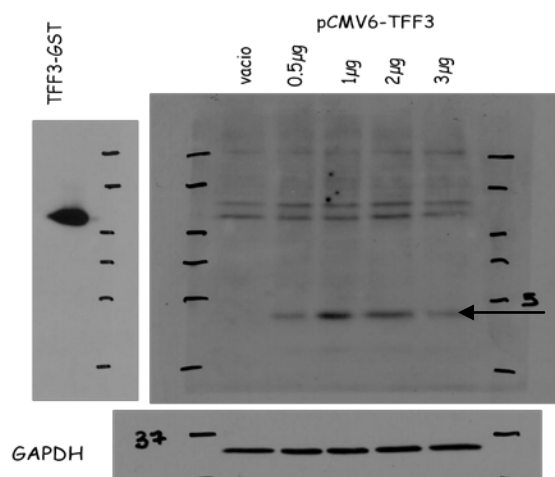


**Figura 41 Western-Blot de líneas de CCR humano. 48 horas tras la adición de 5FU (60  $\mu$ g)**



Por este motivo, se decidió transfectar las células DLD-1 con el vector pCMV6-TFF3 que produce la expresión de TFF3 bajo el control del promotor del citomegalovirus. De esta manera se consiguió observar expresión de TFF3 a las 24 horas de transfectar con 1  $\mu$ g de plásmido (Figura 42 Flecha)

**Figura 42 Western-Blot tras 24 de transfección con vector pCMV6-TFF3**

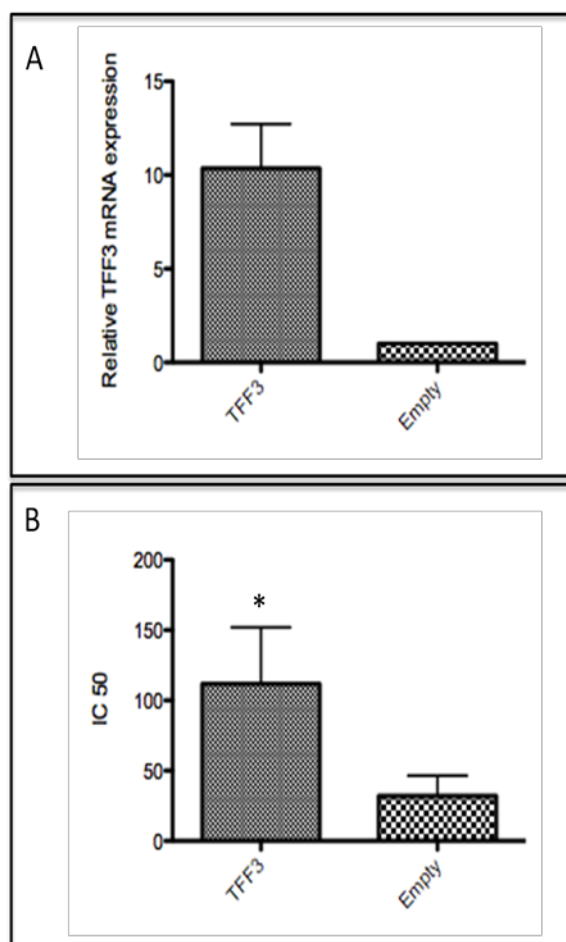


Como puede verse en la figura 43A las células transfectadas con el vector pCMV-TFF3 tenían

una expresión de RNA de TFF3 10 veces mayor que las células transfectadas con vector vacío. Una vez conseguida la expresión estable de TFF3 se comparó la sensibilidad de estas células a 5FU. Como se observa en la figura las células DLD-1 con expresión estable de TFF3 eran significativamente menos sensibles al 5FU: su concentración inhibitoria 50 (IC50) fue de 105,6 (+/-77,98)  $\mu$ mol/L comparada con 43,6 (+/-36,23)  $\mu$ mol/L para las células DLD-1 con vector vacío (Figura 43B) ( $p < 0,05$ ).

**Figura 43. A: expresión de TFF3 en células transfectadas con pCMV6-TFF3 y con vector vacío.**

**B: Incremento de resistencia a 5FU en células transfectadas con vector pCMV6-TFF3**



4.6 Cambios en la expresión génica en células DLD-1 inducidos por TFF3.

Con el objetivo de identificar las vías de señalización reguladas por TFF3, se comparó la expresión completa del transcriptoma en células DLD-1 transfectadas con pCMV6-TFF3 con las células DLD-1 con vector vacío, usando microarrays de DNA. Usando un punto de corte para la diferencia de expresión de al menos 1,5 veces y una significación estadística  $p < 0,05$  se encontraron 62 genes modificados de forma significativa, 23 de ellos infra-expresados y 49 sobre-expresados (Figura 44 y Tabla 18).

El análisis de ontología génica (Gene Ontology) (Tabla 17) mostró que las células transfectadas con TFF3 tenían de forma significativa mayor expresión de genes relacionados con la activación transcripcional como: *transcription initiation* GO: 0006352” ( $P < .001$ ), *protein DNA complex assembly* GO: 0065004” ( $P = .001$ ), o *spliceosome assembly* GO: 0000245” ( $P = .003$ ).

Tabla 17Análisis Gene Ontology

Nombre del grupo de genes	Genes solapados	P
Iniciadores de la transcripción	3	8,85E-4
Complejo de ensamblaje proteína DNA.	3	1,23E-3
Factores de RNA splicing. Mecanismos de transesterificación.	2	2,24E-3
Ensamblaje de spliceosoma	2	2,83E-3
Ensamblaje de complejos macromoleculares.	5	7,15E-3
Iniciadores de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II	2	7,29E-3
RNA splicing vía reacciones de trans-esterificación	2	9,28E-3
Componentes de ensamblaje celular.	5	9,28E-3
Procesamiento RNA.	3	3,18E-2
Complejos de ensamblaje de proteína-RNA.	2	3,28E-2

Figura 44 Genes diferenciados estadísticamente sobre-expresados (rojo) o infraexpresados (verde) ( $p < 0.01$ ) en células que expresan TFF3

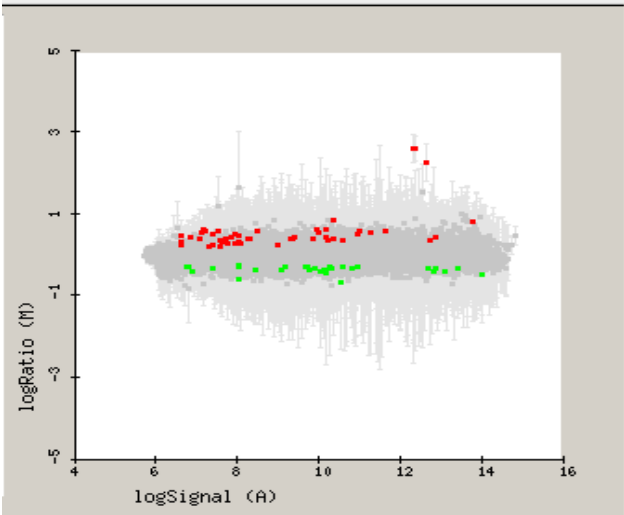


Tabla 18 Genes Diferencialmente Expresados en Células DLD-1 con expresión de TFF3 de forma significativa ( $p < 0.01$ )

Cambio	P	ProbeID	Descripción GEN
<b>6.06</b>	0.00051182	<a href="#">NM_022640</a>	Homo sapiens chorionic somatomammotropin hormone 1 (placental lactogen) (CSH1)
<b>1.83</b>	0.00391397	<a href="#">NM_032336</a>	Homo sapiens GINS complex subunit 4 (Sld5 homolog) (GINS4)
<b>1.75</b>	0.00239312	<a href="#">NM_002165</a>	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 1
<b>-1.60</b>	0.00546639	<a href="#">NM_199461</a>	Homo sapiens nanos homolog 1 (Drosophila) (NANOS1)
<b>1.55</b>	0.00654039	<a href="#">NM_003616</a>	Homo sapiens survival of motor neuron protein interacting protein 1 (SIP1)
<b>1.54</b>	0.00941317	<a href="#">NM_006965</a>	Homo sapiens zinc finger protein 24 (ZNF24)
<b>1.53</b>	0.00582439	<a href="#">NM_138455</a>	Homo sapiens collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1)
<b>1.51</b>	0.00108784	<a href="#">NM_007054</a>	Homo sapiens kinesin family member 3A (KIF3A)
<b>1.51</b>	0.00639353	<a href="#">NM_020235</a>	Homo sapiens bobby sox homolog (Drosophila) (BBX)
<b>1.50</b>	0.00835119	<a href="#">NM_016570</a>	Homo sapiens ERGIC and golgi 2 (ERGIC2)
<b>-1.52</b>	0.00742765	<a href="#">ENST00000356931</a>	Homo sapiens cDNA FLJ43464 fis
<b>1.49</b>	0.00340524	<a href="#">NM_017778</a>	Homo sapiens Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (WHSC1L1)
<b>1.49</b>	0.00905209	<a href="#">NM_001562</a>	Homo sapiens interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) (IL18)
<b>1.46</b>	0.00773904	<a href="#">NM_004719</a>	Homo sapiens splicing factor
<b>1.46</b>	0.00285295	<a href="#">NM_004344</a>	Homo sapiens centrin
<b>1.45</b>	0.00146643	<a href="#">NM_138785</a>	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 72 (C6orf72)
<b>1.45</b>	0.00141864	<a href="#">AK098422</a>	Homo sapiens cDNA FLJ25556 fis
<b>1.43</b>	0.00476230	<a href="#">NM_001799</a>	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog
<b>1.42</b>	0.00170012	<a href="#">NM_004755</a>	Homo sapiens ribosomal protein S6 kinase
<b>1.39</b>	0.00564720	<a href="#">NM_002923</a>	Homo sapiens regulator of G-protein signalling 2
<b>1.39</b>	0.00343788	<a href="#">NM_080881</a>	Homo sapiens drebrin 1 (DBN1)
<b>1.37</b>	0.00392188	<a href="#">NM_013330</a>	Homo sapiens non-metastatic cells 7
<b>1.37</b>	0.00212408	<a href="#">NM_001012651</a>	Homo sapiens natural killer-tumor recognition sequence (NKTR)
<b>-1.38</b>	0.00134427	<a href="#">ENST00000337102</a>	Unknown
<b>1.36</b>	0.00391043	<a href="#">NM_004866</a>	Homo sapiens secretory carrier membrane protein 1 (SCAMP1)
<b>1.36</b>	0.00373256	<a href="#">NM_006837</a>	Homo sapiens COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis) (COPS5)
<b>1.35</b>	0.00459534	<a href="#">NM_004774</a>	Homo sapiens PPAR binding protein (PPARBP)
<b>-1.36</b>	0.00842810	<a href="#">NM_002133</a>	Homo sapiens heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1)
<b>-1.34</b>	0.00416936	<a href="#">NM_020373</a>	Homo sapiens transmembrane protein 16B (TMEM16B)
<b>1.32</b>	0.00269899	<a href="#">NM_017872</a>	Homo sapiens interphase cytoplasmic foci protein 45 (ICF45)
<b>1.31</b>	0.00524019	<a href="#">NM_031435</a>	Homo sapiens THAP domain containing
<b>1.31</b>	0.00792233	<a href="#">NM_145243</a>	Homo sapiens OMA1 homolog
<b>1.31</b>	0.00356608	<a href="#">NM_024761</a>	Homo sapiens MOB1
<b>1.31</b>	0.00930734	<a href="#">NM_014743</a>	Homo sapiens KIAA0232 gene product (KIAA0232)
<b>1.31</b>	0.00900236	<a href="#">NM_022168</a>	Homo sapiens interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1)
<b>1.30</b>	0.00893242	<a href="#">NM_015555</a>	Homo sapiens zinc finger protein 451 (ZNF451)
<b>1.30</b>	0.00977729	<a href="#">NM_014166</a>	Homo sapiens mediator of RNA polymerase II transcription
<b>1.30</b>	0.00523051	<a href="#">NM_138571</a>	Homo sapiens histidine triad nucleotide binding protein 3 (HINT3)
<b>1.30</b>	0.00142244	<a href="#">AK074960</a>	Homo sapiens cDNA FLJ90479 fis



-1.32	0.00573261	<a href="#">NM_001012271</a>	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) (BIRC5)
-1.31	0.00795578	<a href="#">ENST00000273064</a>	Q92600 (Q92600) Homo sapiens protein involved in sexual development
1.29	0.00885789	<a href="#">NM_006134</a>	Homo sapiens transmembrane protein 50B (TMEM50B)
1.29	0.00524066	<a href="#">NM_133462</a>	Homo sapiens tetratricopeptide repeat domain 14 (TTC14)
-1.31	0.00214203	<a href="#">NM_001003845</a>	Homo sapiens Sp5 transcription factor (SP5)
1.28	0.00939318	<a href="#">NM_020375</a>	Homo sapiens chromosome 12 open reading frame 5 (C12orf5)
1.26	0.00681339	<a href="#">NM_016578</a>	Homo sapiens remodeling and spacing factor 1 (RSF1)
-1.28	0.00534871	<a href="#">NM_005262</a>	Homo sapiens growth factor
-1.27	0.00241271	<a href="#">NM_001002762</a>	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog
-1.27	0.00736193	<a href="#">NM_032800</a>	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 198 (C1orf198)
1.25	0.00236329	<a href="#">ENST00000379870</a>	Homo sapiens cDNA FLJ13571 fis
1.25	0.00827771	<a href="#">NM_016374</a>	Homo sapiens AT rich interactive domain 4B (RBP1-like) (ARID4B)
-1.25	0.00373961	<a href="#">XM_291989</a>	PREDICTED: Homo sapiens similar to nucleolar protein 5A (LOC338756)
-1.25	0.00497926	<a href="#">NM_001124</a>	Homo sapiens adrenomedullin (ADM)
-1.24	0.00780272	<a href="#">NM_004624</a>	Homo sapiens vasoactive intestinal peptide receptor 1 (VIPR1)
1.22	0.00617340	<a href="#">NM_024642</a>	Homo sapiens UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 (GalNAc-T12) (GALNT12)
1.22	0.00924376	<a href="#">NM_199324</a>	Homo sapiens OTU domain containing 4 (OTUD4)
-1.24	0.00661920	<a href="#">NM_032714</a>	Homo sapiens chromosome 14 open reading frame 151 (C14orf151)
-1.23	0.00624856	<a href="#">NM_021830</a>	Homo sapiens progressive external ophthalmoplegia 1 (PEO1)
-1.23	0.00692746	<a href="#">BC007366</a>	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 70
-1.23	0.00821032	<a href="#">NM_018347</a>	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 29 (C20orf29)
-1.23	0.00925730	<a href="#">NM_001033046</a>	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 62 (C17orf62)
-1.22	0.00529141	<a href="#">NM_177963</a>	Homo sapiens synaptotagmin XII (SYT12)
1.20	0.00723986	<a href="#">NM_014059</a>	Homo sapiens response gene to complement 32 (RGC32)
-1.22	0.00273867	<a href="#">AK023816</a>	Homo sapiens cDNA FLJ13754 fis
1.20	0.00985125	<a href="#">NM_015446</a>	Homo sapiens AT hook containing transcription factor 1 (AHCTF1)
1.20	0.00674246	<a href="#">THC2376384</a>	C40201 artifact-warning sequence (translated ALU class C) - human {Homo sapiens; } , partial (7%) [THC2376384]
-1.21	0.00659079	<a href="#">NM_012405</a>	Homo sapiens isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT)
1.18	0.00870900	<a href="#">THC2371517</a>	IRO548013 HMG20A {Homo sapiens; } , partial (35%) [THC2371517]
-1.19	0.00848285	<a href="#">NM_001001716</a>	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
1.16	0.00946374	<a href="#">NM_024615</a>	Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family
1.16	0.00885176	<a href="#">NM_022151</a>	Homo sapiens modulator of apoptosis 1 (MOAP1)



# DISCUSIÓN

---



## 5. DISCUSIÓN

**E**n este trabajo hemos analizado la expresión de 53 genes antes y después del tratamiento de quimio-radioterapia para el cáncer de recto obteniendo 24 genes que se modificaban significativamente.

Tras analizar el impacto pronóstico de esta modificación, hemos observado que la sobreexpresión de TFF3 tanto a nivel génico como a nivel proteico conlleva un peor pronóstico. Posteriormente hemos caracterizado la importancia de este gen en células de CCR humano en las que se observa que la sobreexpresión de TFF3 confiere mayor resistencia al 5FU. Además el estudio *in vitro* nos ha mostrado que TFF3 es capaz de alterar la expresión de al menos otros 60 genes, muchos de ellos implicados en vías de proliferación y transcripción proteica. Puede verse un resumen de la investigación realizada en la figura 45.

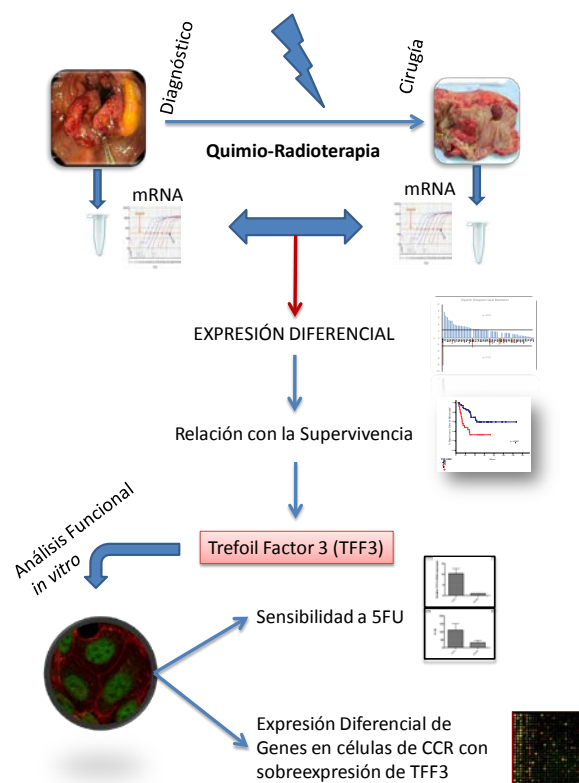
En la presente discusión vamos a abordar primero el análisis de los datos clínico-patológicos y las limitaciones de la metodología, posteriormente el estudio molecular tanto traslacional con muestras de pacientes como *in vitro*, y por último las implicaciones que estos resultados pueden tener en la práctica clínica diaria y futuros proyectos de investigación.

### 5.1 Datos Clínico-patológicos

Dado que uno de los primeros pasos en este trabajo de investigación era determinar el impacto pronóstico del cambio de-expresión de un determinado grupo de genes, es importante un buen estudio de la muestra clínica con la que se correlacionan esos resultados. Los principales parámetros pronósticos en la literatura son la calidad de la cirugía, los ganglios afectados, el estadio patológico, el tiempo entre el tratamiento neoadyuvante con radioterapia y la intervención

quirúrgica, la respuesta al tratamiento neoadyuvante, el esquema de neoadyuvancia administrado y el valor del CEA.

Figura 45 Desarrollo del Proyecto de Investigación



Siempre es importante tener en cuenta estos parámetros a la hora de diseñar un estudio, ya que pueden resultar factores de confusión a la hora de interpretar nuestros resultados, especialmente en un estudio retrospectivo. En este sentido, los pacientes de nuestro estudio tienen unas características similares a las de otros estudios que discutiremos a continuación.

Varios estudios demuestran que la calidad de la cirugía, entendiendo por una cirugía de buena calidad aquella en la que se realiza una ETM, con márgenes de resección circunferencial microscópicos mayores de 1 mm y con una buena disección ganglionar, es un factor determinante en la evolución posterior de los pacientes de cáncer de recto (157, 311-314). En nuestra serie estos parámetros resultan difíciles

de analizar por diversos motivos. En primer lugar, el protocolo vigente en nuestro centro incluía la ETM, pero era llevado a cabo por varios cirujanos diferentes y la calidad de la ETM no se reflejaba en los informes de anatomía patológica, por lo que no existía un control independiente ajeno al cirujano que realizaba el procedimiento. No obstante, debe señalarse que incluso en estudios aleatorizados en los que la ETM es un requisito, con frecuencia el procedimiento es de baja calidad cuando se analiza la resección circunferencial. Teóricamente, el número de ganglios linfáticos extirpados pudiera ser una medida indirecta de la calidad quirúrgica, aunque el análisis macroscópico de la pieza quirúrgica no incluía la realización de técnicas de alto rendimiento para la disección ganglionar, como la digestión de la grasa mesentérica, que se ha demostrado útil para aislar mayor número de ganglios en un artículo reciente (315). Algunos autores consideran que una correcta disección ganglionar de recto, igual que en el cáncer de colon, exige recoger más de 12 ganglios para considerar que la cirugía se ha realizado de forma adecuada aunque esto resulta a menudo complicado debido a la fibrosis que se produce en muchos de ellos por el tratamiento. El número de ganglios extirpados que se obtuvieron en nuestro estudio es similar al de otras series en las que se analizan pacientes sometidos a tratamiento con RT antes de la cirugía. En el estudio realizado por Baxter y cols únicamente se aislaban más de 12 ganglios en el 20% de los enfermos (316). En nuestro caso esta tasa fue del 24% (30/125 evaluables). En otro estudio de Govindarajan y cols, (317) aunque tuvieron una tasa mayor (37% de los pacientes con más de 12 ganglios), demostraron que este punto de corte de 12 ganglios no tenía impacto pronóstico por lo que recoger menos, no se considera algo negativo en el CR tratado con QTRT neoadyuvante. Al respecto las guías del *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) de Estados Unidos recomienda la extirpación de al

menos 10 ganglios linfáticos en pacientes que no han recibido tratamiento neoadyuvante pero no hace recomendaciones sobre el número de ganglios a extirpar en caso de haber administrado tratamiento preoperatorio, debido a la baja tasa de extirpación ganglionar en estos pacientes.

También es destacable que de forma análoga a lo que se observa en otros estudios, el nivel de ypT se relaciona estrechamente con el pronóstico, tanto en SLE como en SG. Esto puede tomarse como medida indirecta de la respuesta al tratamiento preoperatorio, ya que los pacientes con tumores más infiltrantes (ypT3, ypT4) han tenido menos infraestadificación. El hecho de que el estadio clínico no se correlacione con la SLE ni la SG es significativo, ya que pone de manifiesto la importancia del tratamiento sobre el pronóstico de estos enfermos. No obstante, también puede reflejar de manera indirecta los errores de estadificación, que puede hacer que pacientes con tumores más avanzados se identifiquen con un pronóstico mejor. Por lo tanto, tomando de forma conjunta el importante valor pronóstico de ypT e ypN, el estadio patológico determinará en gran medida la probabilidad de recaída de estos pacientes. Como se ha visto en las figuras 26 y 27, los pacientes con estadios 0 y I tienen un pronóstico excelente, muy parecido entre ellos. Sin embargo, los pacientes con estadios II y III tienen una mayor probabilidad de recaída y, por tanto, peor SG. Algunos investigadores postulan que la ausencia de respuesta a este tratamiento (lo que conlleva un mayor estadio patológico), refleja una mayor resistencia al tratamiento quimioterápico, por lo que estos pacientes tendrán un peor pronóstico en la recaída dada la menor quimiosensibilidad.

Otro parámetro que a menudo se menciona en la literatura como influyente a la hora de determinar el pronóstico, es el tiempo que transcurre desde el fin de la radioterapia a la resección quirúrgica. Algunos trabajos sugieren

que el retraso en la cirugía supone un beneficio para el paciente ya que permitimos más tiempo de acción del tratamiento. En un trabajo reciente de García-Aguilar y cols (318), los autores administraron tratamiento estándar a un grupo control con 5FU-RT seguido de ETM a las 6 semanas mientras que al grupo experimental le administraron 5FU-RT seguido de 2 ciclos de FOLFOX-6 y posteriormente ETM entre 3-5 semanas tras la quimioterapia. Un total de 127 pacientes fueron evaluables para la respuesta tumoral (60 grupo control y 67 grupo experimental). El grupo experimental tuvo un incremento del 7% en respuestas patológicas completas (grupo control 18% vs. grupo experimental 25%) sin mayores complicaciones por el tratamiento. Aunque otros trabajos confirmen este hallazgo, en general aún no se ha podido demostrar que este aumento en las respuestas produzca un incremento significativo en la supervivencia. En nuestro estudio, los pacientes han sido tratados de forma homogénea realizándose la ETM entre las 4 y las 8 semanas tras el fin de la QT-RT por lo que no esperamos que esta variabilidad influya en los resultados.

La respuesta a la QT-RT ha demostrado ser un parámetro fundamental a la hora de determinar el pronóstico de estos pacientes. Desafortunadamente existen múltiples clasificaciones para este tipo de respuesta que hace que las comparaciones entre trabajos sean más complicadas. El más utilizado, y por tanto validado es el de Dworak (144), en el que se describían los cambios fibróticos y de densidad celular tras el tratamiento en una escala de 0 a 4, siendo 0 la ausencia de respuesta y 4 la respuesta patológica completa. En nuestro estudio hemos utilizado este sistema con una aclaración posterior que se hizo en el trabajo de validación por Rödel y cols. (145) con pacientes del ensayo clínico CAO/ARO/AIO-94. En ese trabajo se definieron unos puntos de corte numéricos, con porcentajes de fibrosis para determinar el grado de regresión a diferencia del trabajo de Dworak y cols. en el que la puntuación era meramente

descriptiva. En ese trabajo se observó que los pacientes tenían SLE diferentes en función de su TRG, aunque los grupos 0/1 y 2/3 no eran significativamente diferentes entre ellos por lo que se agruparon para el análisis. De esa manera los pacientes con TRG 4, TRG2-3 y TRG0-1 tenían SLE a los 5 años de 86%, 75% y 63% respectivamente ( $p=0,006$ ). Otros trabajos posteriores han confirmado estos hallazgos, incluyendo nuestro grupo (221, 262, 319). En este estudio, curiosamente, los pacientes con TRG 2 y 3 sí que se diferenciaron en el pronóstico con una SLE a los 3 años del 63% para el TRG 2 y del 86% para el TRG 3. El resto de grupos tenían resultados parecidos a la serie de Rödel y cols.

Otro sistema de clasificación de la respuesta ampliamente utilizado es el de Mandard y cols. (320) inicialmente se describió para categorizar la respuesta a la QT-RT del cáncer de esófago, distinguía también 5 grupos de respuesta (del 1 al 5) aunque al contrario que el sistema de Dworak, a mayor numeración significaba menor respuesta (TRG 1: respuesta completa a TRG 5 no respuesta). Este sistema ha sido validado en cáncer de recto ya que en definitiva la clasificación es superponible a la descrita por Dworak (321). En cualquier caso, el parámetro más objetivo y que ha demostrado más claramente correlacionarse con la supervivencia es la repuesta completa por lo que algunos autores consideran simplemente la clasificación dicotómica de respuesta completa sí vs. no (220, 273, 322).

Respecto a los esquemas de quimioterapia utilizados, cabe destacar que aunque en nuestra serie el 45% de los pacientes recibieron oxaliplatino, este siempre iba acompañado de una fluoropirimidina (capecitabina) o de raltitrexed. En cualquier caso, como se ha comentado en la introducción, la adición de oxapliplatino a la fluoropirimidina no produce un mayor beneficio y aunque en ocasiones pueda suponer un aumento en la toxicidad, en ninguno

de los cuatro ensayos aleatorizados hasta la fecha se ha comunicado que haya un efecto deletéreo por añadir este fármaco. Tras la cirugía, el 80% de los pacientes recibieron quimioterapia adyuvante lo cual está todavía en discusión. No existe ningún ensayo clínico prospectivo que haya respondido a esta pregunta de forma específica en el cáncer de recto, aunque el meta-análisis de Petersen y cols. sugiere que la administración de tratamiento adyuvante tras la cirugía de resección curativa del cáncer de recto ofrece un beneficio del 18% en la supervivencia (192).

Por último, cabe destacar como en nuestra serie se confirman los resultados previos destacando la importancia del CEA, tanto como predictor de respuesta a la QT-RT preoperatoria como en la SLE. En el estudio de Das y cols se sugería que el nivel de corte de 2,5ng/mL era significativamente más sensible y específico para determinar la probabilidad de respuesta al tratamiento (220). Nuestro grupo confirmó estos resultados en un trabajo posterior correlacionando, este nivel de CEA pre-tratamiento, no solo con la respuesta a la QT-RT, sino también con la SLE (Apéndice 7.1) (221). Por este motivo en este trabajo hemos utilizado el punto de corte de 2,5ng/mL de CEA sérico pre-tratamiento, obteniendo los resultados esperables con una mejor SLE para los pacientes con niveles por debajo de ese punto de corte.

En resumen, a pesar de haber desarrollado este trabajo en una muestra retrospectiva de pacientes, es destacable la concordancia con otros estudios tanto prospectivos como retrospectivos, llevados a cabo en pacientes con cáncer de recto sometidos a QT-RT preoperatoria. Esto supone una mayor solidez para los resultados obtenidos ya que se han obtenido ante una muestra representativa de pacientes sin características especiales.

## 5.2 Metodología

En este trabajo se han utilizado diversos métodos de análisis de expresión génica, proteica y estadísticos que procederemos a discutir a continuación.

### 5.2.1 Muestras clínicas

Se seleccionaron muestras patológicas procedentes de pacientes fijadas con formol y almacenadas en parafina para extraer el RNA de los tumores tanto antes como después del tratamiento. Hace algunos años no se consideraba esta la manera adecuada de obtener el RNA ya que se encuentra parcialmente degradado y era de elección obtenerlo de muestras congeladas en fresco (323-325). Sin embargo estudios posteriores demostraron que la qPCR se puede aplicar sin problemas a este tipo de tejidos, siempre que se utilicen amplicones suficientemente cortos como para que se mantengan conservadas incluso en tejidos conservados de esta manera durante años. Esto supone una gran ventaja ya que la fijación con formol y posterior parafinación es la manera habitual de conservar las muestras patológicas en los hospitales por lo que se amplía la posibilidad de analizar multitud de muestras de pacientes tratados a lo largo de amplios periodos de tiempo incluso en distintos hospitales. De hecho la equivalencia entre los resultados obtenidos de muestras obtenidas en fresco y de muestras parafinadas se ha analizado comprobándose que con una adecuada normalización de la expresión se pueden obtener resultados válidos con una concordancia superior al 90% (326, 327). Por estos motivos, la mayoría de los estudios de expresión génica desde 2005 utilizan muestras parafinadas dando lugar a perfiles de expresión con valor pronóstico (328-330).

Una de las críticas a los estudios de expresión génica proviene de un trabajo de Gerlinger y cols. en el que se estudia la variabilidad



intratumoral de la expresión en cuatro hipernefomas. En este trabajo demuestran que realizando múltiples biopsias en distintas zonas del tumor y en las metástasis, se obtienen no sólo distintos patrones de expresión, si no un perfil mutacional diferente que puede ser reflejo de la expansión clonal tras adquirir sucesivos cambios génicos que otorguen a la célula tumoral una ventaja evolutiva siguiendo un modelo de selección Darwiniana (331). Por este motivo, múltiples protocolos de investigación básica están desarrollando la manera de realizar trabajos de expresión génica mediante RT-qPCR a nivel de una sola célula (332, 333). En nuestro caso, las muestras eran revisadas para asegurar que más del 75% eran células tumorales aunque no existe posibilidad de controlar la variabilidad intratumoral. No obstante, el caso del CCR es diferente al hipernefoma y aunque es imposible determinar la variabilidad intratumoral se ha visto en múltiples trabajos que la correlación de mutaciones en el tumor primario y la metástasis es superior al 90% (96, 334).

Para la confirmación de los resultados obtenidos a nivel de expresión, decidimos realizar la tinción inmunohistoquímica (IHQ) en las piezas quirúrgicas. Aunque existe una amplia experiencia con esta técnica, la implementación de nuevos biomarcadores ha estado clásicamente entorpecida por la variabilidad interobservador y los puntos de cortes que ha hecho que, en ocasiones, se deba complementar esta técnica con otras como la hibridación *in situ* con fluorescencia (*FISH*). Existen multitud de trabajos en los que se explora la utilidad de esta técnica en la predicción de la respuesta al tratamiento neoadyuvante analizando diferentes proteínas y los resultados han sido dispares. En un trabajo realizado por nuestro grupo, pudimos comprobar como la realización de IHQ sobre un microarray de tejido (TMA) daba una visión parcial de la expresión en el tumor y cuando se correlacionaba con la biopsia completa, la concordancia era baja ( $\kappa=0.54$ ) (262). Sin embargo para este trabajo, se confirmó la

expresión en la muestra completa y además no se seleccionó un punto de corte aleatorio si no que la sola presencia de la tinción dentro de las microglándulas tumorales se consideró como positivo. Con este modelo dicotómico la variabilidad interobservador se espera sea muy baja y hace que este factor pronóstico pueda ser aplicado a la asistencia clínica diaria, a diferencia de la RT-qPCR.

### 5.2.2 Estudio *in vitro*

Para investigar la importancia biológica de TFF3, se seleccionaron 10 líneas de cáncer colorrectal humano: HT-29, SW480, SW620, T84, DLD-1, RKO, WiDr, COLO201, LoVo y HCT116. Interesantemente en ninguna de estas células se observó expresión basal de TFF3. Esto no resulta sorprendente ya que estas células se consideran como estirpes tumorales del precursor común de las células del epitelio intestinal que aún no se han diferenciado para expresar marcadores de diferenciación intestinal. Por ejemplo, las células HT29 pueden expresar marcadores de células *stem* de las criptas en presencia de los factores adecuados. Un subtipo celular derivado de estas, Cl.16E sin embargo sí que es capaz de expresar TFF3. Interesantemente este subtipo ya no es pluripotencial y se encuentra restringido al linaje de células caliciales de las criptas intestinales (335). Además estas células tienen una expresión dinámica de TFF3 de forma que cuando se encuentran proliferando la expresión es elevada mientras que cuando confluyen la expresión disminuye (336). Esto ha podido afectar a la capacidad de expresión de esta proteína, ya que otros autores sí que detectaron expresión de TFF3 en células SW620 mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (337). Por este motivo se decidió transfectar TFF3 mediante el vector pCMV6 en células DLD-1 que son las que producen tumores más diferenciados histológicamente, llegando incluso a formar estructuras glandulares (338) En el experimento de estímulo con 5FU no se observó

que TFF3 se indujera como consecuencia del tratamiento. Esto es en cierta manera esperable, ya que TFF3, como se ha comentado antes, es una proteína de secreción que tan solo pueden expresar células con diferenciación epitelial debido a que la acción de TFF3 es puramente paracrina tras secretarse. Por este motivo, la expresión de TFF3 tuvo que ser inducida mediante un vector (pCMV6-TFF3) que produjo buenos resultados de expresión, tanto génica como proteica. Gracias a esto se pudo realizar un experimento de expresión completa del transcriptoma y compararlo con las células transfectadas con vector vacío. Para ello se utilizaron microchips de expresión genómica completa con capacidad de detección de 44.000 transcritos (Agilent Technologies) que es por tanto capaz de detectar la mayoría de mRNA conocidos. Por lo tanto, a diferencia de los experimentos previos con RT-qPCR, en este caso se generan miles de datos difíciles de interpretar que deben ser analizados mediante herramientas de estadística informática (339). El objetivo de estas herramientas es detectar cambios reales en la nube de modificaciones que tengan trascendencia biológica y desechar aquellos que sean "ruido de fondo". De esta manera, los métodos de *gene set enrichment* pretenden analizar grupos de genes con acciones relacionadas que confirmen la importancia biológica de esos cambios. El método utilizado por nosotros fue *gene set enrichment analysis* (GSEA), que es uno de los más frecuentemente utilizados (303). Este método parte de un conocimiento *a priori* de la relación de diferentes vías de señalización celular y compara los cambios producidos en la expresión de los genes que la componen. Para el análisis, los genes se clasifican en función del ratio "señal/ruido" (*signal to noise ratio*) y se calcula una suma para los genes de cada grupo en relación con aquellos de grupos diferentes. La manera de obtener el estadístico para este análisis puede variar, y en nuestro caso se utilizó el algoritmo Limma, aunque no existe una clara

evidencia de que otros algoritmos sean superiores (340, 341). Además este método tiene una ventaja frente a otros sistemas como no tomar ningún punto de corte arbitrario para cada gen si no que utiliza toda la información obtenida en el análisis. Por el contrario, uno de los inconvenientes de utilizar esta técnica es que presupone que una mayor diferencia de expresión implica una mayor importancia biológica, cosa que no es siempre cierta (342). Esta metodología ha sido aplicada recientemente en conjunción con modelos de correlación gen/proteína para descubrir nuevas vías de señalización importantes en células de CCR humano. De esta manera Sonachalam y cols. utilizaron GSEA para analizar resultados públicos de estudios de arrays de expresión y posteriormente construyeron una red de interacción proteína-proteína codificadas por los genes encontrados. De esta manera identificaron sub-redes de señalización importantes en la progresión del CCR reguladoras de la apoptosis (TP53), reparación del DNA (PCNA) y el sistema inmune (IL8) (343).

### 5.2.3 Genes seleccionados

La selección de los genes candidatos a ser evaluados se produjo en el trabajo previo (Apéndice 7.1) en el que mediante una estrategia combinada se seleccionaron varios genes mediante SAGE y otros de forma dirigida por la posible importancia biológica en el CCR. El hecho de haber obtenido con esta estrategia un perfil de expresión génica pronóstico/predictivo de respuesta, resalta la importancia de este grupo de genes por lo que su expresión dinámica antes-después del tratamiento resultaba especialmente interesante. Es destacable que TFF3 fue descubierto en ese trabajo previo mediante el estudio de SAGE ("ciego") por lo que resalta aún más la importancia de haber realizado una estrategia combinada para seleccionar los genes que iban a ser estudiados en este trabajo.

### 5.3. Discusión sobre los resultados

Este trabajo se compone de dos partes claramente diferenciadas. En primer lugar se realizó un estudio comparativo de la expresión génica antes-después del tratamiento y la correlación de esos resultados con la evolución de los pacientes. En segundo lugar, tras observar que TFF3 podía tener un papel importante en la evolución del cáncer de recto se realizó un estudio funcional *in vitro*, por lo que analizaremos estos resultados de forma separada.

#### 5.3.1 Cambios en la expresión génica inducidos por la quimio-radioterapia.

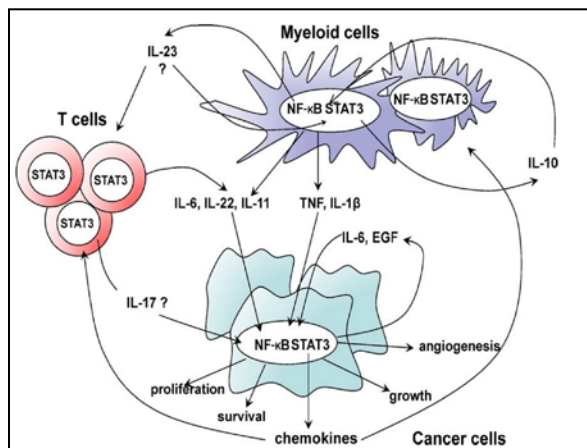
De los 53 genes analizados, 24 de ellos se modificaron de forma significativa tras el tratamiento. Es de destacar que tan solo 2 de ellos disminuyeron la expresión, mientras que 22 se sobre-expresaron. El gen que se modificó más significativamente fue *P4HTM* (prolil-4-hidroxilasa) que disminuyó su expresión tras el tratamiento. Este gen codifica una proteína (prolil-hidroxilasa) encargada de la regulación post-trasncricional de *hypoxia inducible factor* (HIF), el regulador principal de la angiogénesis. En resumen, el papel de esta prolil-hidroxilasa es hidroxilar HIF para que sea reconocido por el proteasoma y degradado en condiciones de normoxia. En situaciones de hipoxia, la ausencia de oxígeno intracelular evita la acción de las prolil-hidroxilasas por lo que HIF puede ejercer de factor de transcripción incrementando la expresión de genes pro-angiogénicos como VEGF (344). Este hallazgo resulta por tanto lógico ya que supone que el daño provocado por el tratamiento radioterápico provoca una fibrosis vascular con la consecuente hipoxia y disminución de factores que interfieran con la neo-angiogenesis como las prolil-hidroxilasas. El otro gen que disminuyó su expresión fue ITGB4 (integrina beta-4). Este gen codifica la subunidad beta-4 de las integrinas, proteínas transmembrana reguladoras de la migración y proliferación celular al coordinar factores de

crecimiento con moléculas de adhesión intercelular como los hemidesmosomas o con proteínas de la matriz extracelular (345). Las integrinas, por tanto, se componen de dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y existen 24 heterodímeros formados por 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ . El tipo de heterodímero determinará a que proteína se unirá. En el caso de la subunidad  $\beta 4$  tiende a asociarse con la subunidad  $\alpha 6$  y sirven de receptor de *lamininas*, proteínas de la matriz extracelular presentes en la membrana basal (346). Por lo tanto, estas proteínas regulan la capacidad de invasividad de las células tumorales. La baja expresión de  $\alpha 6 \beta 4$  en células de CCR se asocia a una mayor desdiferenciación con pérdida de la polaridad celular y mayor capacidad de invasividad y metástasis (347). Esto también se ha visto en modelos *in vivo* murinos inyectados con células de CCR humano (LoVo), de forma que aquellos que recibían anticuerpos anti- $\beta 4$  presentaban mayor número de metástasis (348).

En cuanto a genes sobre-expresados, hubo una mayor variedad. Seis de esos genes eran importantes reguladores de la proliferación celular/apoptosis: BCL2, RELB, CCNB1IP, FOS, STAT3 y CDKN1. El caso de BCL2 es especialmente importante ya que es uno de los principales inhibidores de la apoptosis celular. La proteína se sitúa en la capa externa de la membrana mitocondrial, inhibiendo la vía intrínseca de la apoptosis. Juega por lo tanto, un papel importante en la progresión neoplásica (349). En la década de 1990 se observó que BCL2 era capaz de bloquear la apoptosis inducida por quimioterapia (350). Experimentos posteriores demostraron que el nivel de expresión de BCL2 se correlacionaba de forma directa con la sensibilidad a 5FU en células de CCR (351). Por otra parte, RELB está implicada en la regulación directa de BCL2. Esta proteína forma parte de la vía no canónica de NF-KappaB y es conocido que en la región promotora de BCL2 existe una zona de unión a NF-KappaB

que aumenta la transcripción de esta, inhibiendo la apoptosis (352). La influencia de esta vía en cáncer ha sido estudiada ampliamente en células de cáncer de mama, donde se ha visto que la sobre-expresión de RELB incrementa la expresión de BCL2 y promueve un fenotipo más invasivo. Además la 1,25-dihidroxivitamina D3 se ha visto que reduce la expresión de RELB e incrementa la sensibilidad de estas células a la radiación ionizante, por lo que podrían extrapolarse estos resultados a células de CCR (353). Sin embargo, la importancia de esta relación BCL2-RELB en CCR no ha sido estudiada a fondo por lo que nuestros resultados podrían abrir nuevas vías de investigación para ampliar, además, los fundamentos teóricos del beneficio de la vitamina D en el CCR (354). Interesantemente también encontramos sobre-expresado el factor de transcripción STAT3 el cual se correlaciona con la vía de NF-KappaB para expresar genes anti-apoptóticos, de proliferación y de respuesta inmune que regula el microambiente de las células infiltrantes en los tumores (355). Puede verse un esquema de esta co-regulación en la figura 46.

**Figura 46 Interacción Funcional entre NFkB y STAT3 en células del sistema inmune y su repercusión en la célula tumoral (tomado de Ref (355))**



Otro regulador de la proliferación celular que hemos encontrado sobre-expresado es FOS. Es un factor de transcripción que se dimeriza con JUN para formar AP-1, el cual produce la

transcripción de múltiples genes implicados en la proliferación celular y apoptosis como por ejemplo ciclina-D1 que regula la progresión del ciclo celular en G1 (356). Un estudio reciente de Hughes y cols. examinó los cambios en la expresión génica tras el tratamiento con 5FU-RT en cáncer de recto encontrando este gen sobre-expresado. Sin embargo, en su estudio *in vitro*, esta sobre-expresión no confería resistencia al tratamiento por lo que hipotetizaron que este cambio se produce como evolución natural del tumor y no como consecuencia del tratamiento (357). Nuestro hallazgo confirma estos resultados aunque no podemos descartar que el tratamiento haya influenciado la expresión de este gen. Es destacable que la vía de las MAP-kinasas (MAPK) es una reguladora principal de este gen (358) por lo que la sobre-expresión puede estar reflejando una hiperactividad de esta vía que es a su vez estimulada por TFF3, resultado que analizaremos en detalle más adelante.

Otro de los genes reguladores del ciclo celular que encontramos sobre-expresados tras el tratamiento fue CCNB1IP1 (*cyclin B1 interacting protein 1*). Este gen, codifica una proteína miembro de la familia de las ubiquitin-ligasas que regula la transición en la fase G2/M. Inicialmente fue denominado *human enhancer of invasion clone 10* (HEI10) observándose que promovía la degradación de la ciclina B durante G2 (359). Trabajos posteriores demostraron que esta proteína jugaba un papel fundamental en la progresión del ciclo celular trasladándose a células tumorales donde se comprobó por ejemplo, que células metastásicas de melanoma tenían un aumento en la expresión de este gen (360). En otro experimento de Singh y cols. se comprobó como HEI10 era necesaria para la replicación de células de carcinoma de mama (MCF7) y osteosarcoma (U20S). de manera que las células tratadas con siRNA anti-HEI10 no proliferaban adecuadamente. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, la inhibición de la expresión de esta proteína promueve la invasión

mediante la sobre-expresión de proteínas reguladoras como *paxillin* y *FAK* (*Focal Adhesion Kinase*) (361). La interpretación por tanto de nuestros hallazgos, basándonos en estos resultados resulta complicada aunque parece claro que de forma general, la sobre-expresión de *CCNB1IP1* ejerce un importante papel regulador del ciclo en G2 justo donde la acción de la radioterapia en el daño celular es mayor (362). Por otro lado, la sobre-expresión de *CDKN1* (p21) no es extraña ya que se trata de otra proteína reguladora del ciclo celular que induce una parada en G1 tras producirse un daño en el DNA (363). Es por lo tanto un gen supresor de tumores que ha sido implicado en la radioresistencia al detener el ciclo celular y permitir la reparación de los daños producidos durante el tratamiento (364). Numerosos agentes inhibidores de esta proteína se encuentran actualmente en desarrollo pre-clínico y puede ser por tanto interesante su aplicación en esta patología si se demuestran seguros para su administración en humanos (365). También encontramos sobre-expresado tras el tratamiento a *RCC1* (*Regulator of Chromosome Condensation 1*) el cual se trata de un regulador no solo del ciclo celular, al colaborar en la condensación de la cromatina, sino también de la señalización intracelular al ejercer de factor intercambiador de nucleótidos de guanina (*GEF: guanine nucleotide exchange factor*) encargándose de la activación de RAN (Ras-related nuclear) -proteína G-monomérica de la superfamilia RAS- (366). Hasta la fecha sin embargo no se han encontrado alteraciones en este gen que tengan impacto en el desarrollo del CCR. Sí que se ha descrito la sobreexpresión de una proteína con dominio-similar-a-*RCC1* (*RLD: RCC1-like domain*) sobreexpresada en células de carcinoma de mama humano (367). Todos estos hallazgos destacan en su conjunto la alteración que produce el tratamiento sobre la maquinaria de regulación del ciclo celular.

Otro grupo de genes que se sobre-expresaron tras el tratamiento están relacionados con la

respuesta a la quimioterapia. Resulta interesante ver cómo tanto TYMP (timidina fosforilasa) como DPD (dihidropirimidin-deshidrogenasa) aumentaron su expresión, ambos relacionados con la sensibilidad a las fluoropirimidinas. Como se comentó en la introducción la TYMP es una enzima importante en el metabolismo de las fluoropirimidinas orales, guiando el paso de la formulación oral a 5FU en la célula tumoral, mientras que la DPD es la enzima limitante en el catabolismo de 5FU (368). Parece lógico por tanto, que la expresión de DPD aumente como consecuencia del tratamiento en un intento por parte de la célula tumoral de catabolizar el fármaco, y que este aumento se correlaciona de forma directa con la sobre-expresión de TYMP como se ha visto en estudios con pacientes con CCR avanzado (369). En cáncer de recto, sin embargo, no existen trabajos que analicen la evolución dinámica de estos marcadores, aunque han sido ampliamente estudiados en la biopsia pre-tratamiento sugiriéndose en varios estudios que la expresión de TYMP se correlaciona con la respuesta (370). En un trabajo reciente de Tanaka y cols. se midió la expresión de TS, DPD y TYMP en las piezas quirúrgicas de 40 pacientes tratados de un cáncer de recto con QTRT neoadyuvante. Aquellos pacientes (N=6) que tuvieron recaídas tenían mayor expresión de los tres genes (371). En nuestro caso, aunque hemos observado que de forma global la expresión de TYMP y DPD aumenta, no hemos visto que este hecho se correlacione con una peor SLE y dado que la muestra de pacientes es mayor que la de Tanaka y cols., no se puede asegurar que su resultado no sea producto del azar. Por otro lado, el gen de *ALDH1A1* codifica una enzima de la familia de las aldehído-deshidrogenasas, fundamentales para el metabolismo de diversos compuestos, entre ellos el etanol. Sin embargo la importancia de esta enzima va más allá. A finales de 1999, Storm y cols. demostraron que las células madre hematopoyéticas (HSCs) eran ricas en *ALDH* de forma que utilizando sustratos fluorescentes

para ALDH eran capaces de aislar estas células del cordón umbilical (372). Estudios posteriores comprobaron que la señalización vía ácido retinoico era fundamental para la auto-renovación de estas células madre y este proceso era dependiente de ALDH (373, 374). En estos estudios, las células con mayor expresión de ALDH presentaban una capacidad de proliferación significativamente mayor y, por lo tanto, tumorigénica. Estos resultados se han trasladado al estudio de los tumores sólidos y Chen y cols. han comprobado mediante IHQ que los tumores de colon más agresivos presentan mayor positividad a ALDH1A1 (375). Las bases moleculares de estos hallazgos son desconocidas, sin embargo existen diversas hipótesis, que asocian a estas enzimas con la detoxificación de aldehídos derivados de la quimioterapia provocando resistencias al tratamiento (376).

Otras dos enzimas sobre-expresadas tras el tratamiento que guardan relación con la actividad metabólica celular son creatina-kinasa B (CKB) y glutathion S-transferasa pi-1 (GSTP1). El gen CKB codifica la subunidad B de la creatina kinasa (también conocida como creatina fosfoquinasa). Esta enzima citoplasmática está implicada en la homeostasis energética celular. Funciona como reservorio de ATP ya que cataboliza la reacción reversible ATP+creatina para formar ADP y fosfocreatina, por lo que en situaciones de estrés celular se obtendrá ATP de las reservas de fosfocreatina mediante la reacción inversa (377). Es interesante que aunque la expresión de CKB se encuentra aumentada en distintos cánceres, en cáncer de colon se encuentra disminuida en relación con el tejido normal del colon (378). Sin embargo, sí se ha comprobado que la sobre-expresión de CKB en células de cáncer de colon puede surgir como consecuencia de diversos estímulos nocivos para la célula como puede ser el tratamiento con 5FU (379, 380), lo cual puede justificar nuestros hallazgos. Por otra parte, la enzima GSTP1 sí que presenta una expresión generalmente alta en

células de CCR (381). Al igual que CKB, esta proteína tiene una función detoxificadora al catalizar las reacciones de conjugación de glutathion a compuestos electrofílicos (382). La sobre-expresión de esta enzima en células tumorales se ha asociado en estudios pre-clínicos a una menor sensibilidad a la quimioterapia (383). Esto parece ser así al menos en algunos tipos histológicos como el cáncer de mama donde las pacientes que presentaban mayor expresión de GSTP1 presentaban una menor tasa de respuestas patológicas completas (384). En CCR metastásico también se ha correlacionado la menor expresión de este gen con una mayor supervivencia en pacientes tratados con QT (385). Parece por tanto lógico que en nuestra serie de pacientes este gen se sobre-exprese como reacción al tratamiento QTRT aunque nosotros no pudimos encontrar una clara correlación con la supervivencia.

Otros dos genes relacionados en cierta manera que incrementaron su expresión fueron EEF2 y PSMB6, aunque estos codifican proteínas con acciones opuestas: síntesis y degradación proteica. EEF2 se encarga de promover la movilización de la cadena de aminoácidos a través del ribosoma. Esta enzima es regulada mediante fosforilación/defosforilación por la EEF2 kinasa, que se encarga de inhibir la acción de EEF2 en situaciones de alto consumo energético celular (386) o hipoxia (387). Nakamura y cols. (308) demostraron que EEF2 se encontraba expresado en el 93% de los cánceres gástricos y 92% de cánceres de colon y recto aproximadamente. La inhibición de la transcripción de esta proteína con un RNA de interferencia resultó en una disminución significativa del crecimiento celular en líneas celulares de cáncer gástrico y CCR (SW620). Mediante citometría de flujo, comprobaron que se producía una parada en el ciclo celular en G2/M y se producía la inactivación de Akt y Cdc2 así como una activación de EEF2-kinasa, el inhibidor de EEF2. Por otro lado, la sobre-expresión de EEF2 producía una mayor

tumorigenicidad cuando eran implantadas en ratones, demostrando una interrelación entre traducción proteica y regulación de ciclo celular. Por el contrario el gen PSMB6 codifica la subunidad beta tipo 6 del proteasoma con efectos contrarios a la síntesis proteica. Las proteínas del proteasoma se encargan de la degradación de proteínas alteradas, y por tanto, una disminución de la actividad de este sistema se asocia a enfermedades degenerativas por depósito anómalo proteico como el Parkinson (388). En el cáncer, el proteasoma ha sido diana terapéutica con el objeto de provocar una muerte celular al ser la célula tumoral incapaz de deshacerse de proteínas acumuladas, dando como resultado el bortezomib, usado en el mieloma múltiple (389). Sin embargo, todavía no está claro como la inhibición inespecífica del proteasoma puede matar selectivamente las células tumorales y existen diversas hipótesis que lo asocian con la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B, inducción de apoptosis por p53 o interferencia con las proteínas del ciclo celular (390). Estudios *in vitro* con células de CCR han demostrado que tras ser tratadas con bortezomib se produce una parada del ciclo celular en G2/M debido a una activación de la vía *ataxia telangiectasia mutated* (ATM)- *cell cycle checkpoint kinase 1* (CHK1) (391). Desafortunadamente, esta terapia fue investigada en un ensayo clínico fase II con 102 pacientes afectados de CCR metastásico sin encontrarse una sola respuesta objetiva (392). El hecho de que en nuestra muestra de pacientes este gen se haya sobre-expresado tras el tratamiento QTRT resulta por tanto intrigante y no es sino una muestra más de la alta complejidad de este sistema regulador que puede servir para deshacerse de proteínas pro-apoptóticas como p53. En relación con estos dos genes que hemos comentado, cabe destacar que también encontramos una sobre-regulación de *PIK3R1*, que codifica la proteína p85 $\alpha$ , la subunidad reguladora de la fosfatidil-inositol 3 kinasa (PI3K). La importancia de PI3K en cáncer ha

sido reconocida desde hace más de 20 años ya que es una proteína efectora de la cascada de regulación de receptores transmembrana como EGFR, VEGF o FGF entre otros. Múltiples genes implicados en esta vía de señalización tienen transcendencia en el CCR. Por ejemplo, las mutaciones germinales en *PTEN* - proteína inhibidora de la señalización de esta vía - produce el Síndrome de Cowden (hamartomas y CCR) (393). Por otro lado, las mutaciones en la subunidad reguladora de PI3K (p110) son relativamente frecuentes en el CCR esporádico. En la mayoría de estudios se encuentra una tasa de mutaciones en los exones 9 y 20 del 15% aproximadamente (394, 395). No obstante en un estudio en el que se analizaron todas las regiones exónicas de este gen, se encontró una tasa de mutaciones del 32% en CCR lo que sugiere que algunas ocurren fuera de los puntos calientes de los exones 9 y 20 (396). Aunque la importancia directa de la subunidad reguladora p85 $\alpha$  en la carcinogénesis colorrectal es menos entendida, también se han descrito mutaciones en su gen. En un elegante trabajo de Philp y cols (397) secuenciaron los exones 12, 13, 14 y 15 de *PIK3R1* en células de CCR humano y tumores obtenidos de pacientes. Encontraron que las mutaciones que afectan al exon 13 del gen son oncogénicas ya que afectan la capacidad reguladora de p85, produciéndose una activación constitutiva de p110. De hecho, se han encontrado mutaciones en *PIK3CA* que no afectan a la región catalítica directamente si no a la zona de unión con p85, con similares resultados (398-400). Se ha comprobado que la inhibición de la transcripción de p85 mediante un RNA de interferencia produce una disminución en la capacidad de invasividad celular con una parada del ciclo celular en G1/G0 (401). Existen múltiples inhibidores tanto de PI3K como de otras proteínas implicadas en su señalización aunque hasta la fecha no se conoce con exactitud que subtipo molecular de pacientes con CCR se beneficiarán de estas terapias (108). Resulta por tanto de una elevada

transcendencia el hecho de que el tratamiento con quimio-radioterapia pueda inducir la expresión de p85 aunque no hemos encontrado una correlación directa de este fenómeno con una mayor agresividad tumoral. Es posible que esto pueda ser utilizado en el futuro como una diana molecular más.

Otro de los genes que encontramos sobre-expresados era ERCC1 (*excision repair cross-complementing 1*) implicado en la reparación por excisión de nucleótidos (*NER: nucleotide excision repair*), uno de los principales mecanismos de defensa de las células ante el daño en el DNA. El tratamiento con platinos produce una alteración en la cadena del DNA mediante la formación de adductos que son reparados mediante este sistema (402). Este sistema se compone de múltiples proteínas que se unen al DNA y reparan la zona dañada por pasos. Una de las proteínas más importantes de este sistema es ERCC1 la cual actúa como endonucleasa junto a XPA1 produciendo un corte en la región 5' de unos 20 nucleótidos que será posteriormente reparado sin errores al mantener la cadena complementaria que servirá como molde (403). Varios estudios *in vitro* correlacionan de forma directa la expresión de ERCC1 en células de CCR humano con la sensibilidad a oxaliplatino, de manera que aquellas células con mayor expresión resultan más sensibles al tratamiento (404-406). Estos hallazgos han sido también sugeridos en muestras de pacientes donde diversos trabajos retrospectivos coinciden en relacionar una mayor expresión de ERCC1 con una menor supervivencia en pacientes con CCR tratados con oxaliplatino (407, 408). Resulta por tanto significativo que en nuestros pacientes, tratados el 45% con oxaliplatino, la expresión de ERCC1 aumentara como efecto del tratamiento. No es de extrañar sin embargo que esto haya sucedido también en pacientes no tratados con oxaliplatino, ya que la propia radioterapia es capaz de inducir daños en la cadena de DNA que, aunque principalmente requieren el sistema

BER (*base excision repair*) también son reparados mediante el sistema NER (409). Estos resultados no han sido reproducidos por todos los autores. Fakih y cols realizaron un ensayo clínico fase II con 25 pacientes con cáncer de recto que recibieron tratamiento neoadyuvante con capecitabina y oxaliplatino concomitante con la radioterapia a los que repitieron la biopsia el día 3 de tratamiento (410). En su estudio los niveles de expresión de ERCC1 no se modificaron significativamente aunque es probable que el corto espacio de tiempo (la biopsia era el día 3 de tratamiento) haya podido influir en las diferencias que nosotros hemos observado. En cualquier caso nuestro resultado tampoco resultó ser un factor pronóstico y aquellos pacientes que no sobre-expresaron ERCC1 no tuvieron mejor pronóstico ni mayor respuesta.

El último grupo de genes que encontramos sobre-expresados codifican proteínas de secreción: COL1A1, SPARC y TFF3. El primero codifica la cadena  $\alpha 1$  del colágeno tipo I. Las mutaciones en este gen (germinales) se correlacionan con enfermedades del colágeno como la osteogénesis imperfecta, el síndrome de Ehlers-Danlos y la osteoporosis idiopática (411). Aunque la relación de este gen con el desarrollo de neoplasias no es bien conocida sí que se ha correlacionado con la capacidad de invasividad celular. Li y cols. diseñaron varios shRNA para silenciar este gen en células de cáncer gástrico (BGC-823) y observaron que disminuía significativamente la capacidad de proliferación y migración de las células (412). Esto también se ha visto *in vitro* en células de hepatocarcinoma (413). A diferencia de las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno, la proteína SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) forma parte de un grupo de proteínas no estructurales que se encuentran en la matriz extracelular llamadas proteínas matricelulares. La función de este tipo de proteínas es controlar diversos procesos



celulares como la diferenciación tisular (414). La proteína SPARC es capaz de unirse a colágeno tipo fibrilar y al tipo IV encontrado en la membrana basal. Regula la actividad de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) - familia de enzimas consideradas los mediadores de la proteólisis y recambio de la matriz extracelular. De forma global, se considera que la actividad de SPARC en la tumorigenesis está disminuida (415), aunque los estudios en cultivos celulares han demostrado que su efecto es dependiente del contexto celular. De esta manera, en células de glioma es capaz de incrementar la actividad de MMP-1 y MMP-2 y en células de cáncer de mama incrementa la actividad de MMP-2. Por el contrario, en células de melanoma no ejerce efecto alguno sobre estas proteínas (416-418). Respecto a la tumorigenesis del CCR, se sabe que esta proteína no se expresa en el epitelio intestinal adulto pero sí en el fetal y en el estroma de tumores de colon (419). Su expresión está regulada por diversos factores como Smad4 que es capaz de disminuir sus niveles (420) aunque también se ha visto que en tumores de colon se produce un silenciamiento epigenético por metilación del promotor de *SPARC* (421). En un estudio con muestras de cáncer de colon de 114 pacientes, la ausencia de expresión de SPARC en células del estroma tumoral se correlacionó con menor supervivencia (422). Esto se comprobó en un segundo estudio con 1000 muestras de pacientes con cáncer de colon estadios II y III en los que aquellos con mayor

expresión de SPARC (por IHQ) tenían mejor pronóstico (423). No está del todo claro si el impacto pronóstico de la expresión de SPARC surge por una mayor agresividad tumoral (factor pronóstico independiente) o por el contrario produce una mayor resistencia al tratamiento (factor predictivo). En cualquier caso, se ha visto que el tratamiento con agentes hipometilantes (5-Aza) es capaz de incrementar la expresión de SPARC y secundariamente hacer las células de CCR más sensibles al tratamiento con 5-FU (424). Resulta por tanto intrigante nuestro resultado al observar que de forma global en nuestra serie la expresión de *SPARC* aumentaba como consecuencia del tratamiento con QTRT. La interpretación es si cabe más complicada al estar ampliamente expresada en el estroma tumoral y, aunque tal y como se explica en la sección de Material y Métodos, intentamos un enriquecimiento tumoral superior al 75%, es posible que la contaminación del estroma tenga una importancia mayor en este caso. Futuros estudios con microdissección pueden ayudar a contestar esta pregunta.

Por último cabe destacar la relación encontrada entre estos genes. Mediante un análisis con el *IPA Ingenuity Software* se confirmó que los genes encontrados tenían relación en: *muerte celular, ciclo celular, morfología celular, desarrollo celular, crecimiento y proliferación* ( $p < 0,001$ ). Se obtuvieron dos redes de señalización que mostraron relaciones en 19 de los 24 genes (Figuras 47 y 48).

Figura 47 Red de Señalización 1

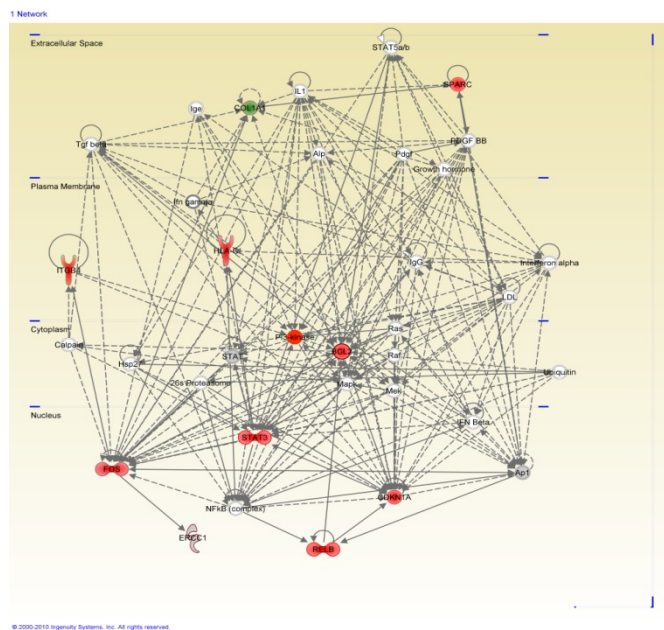
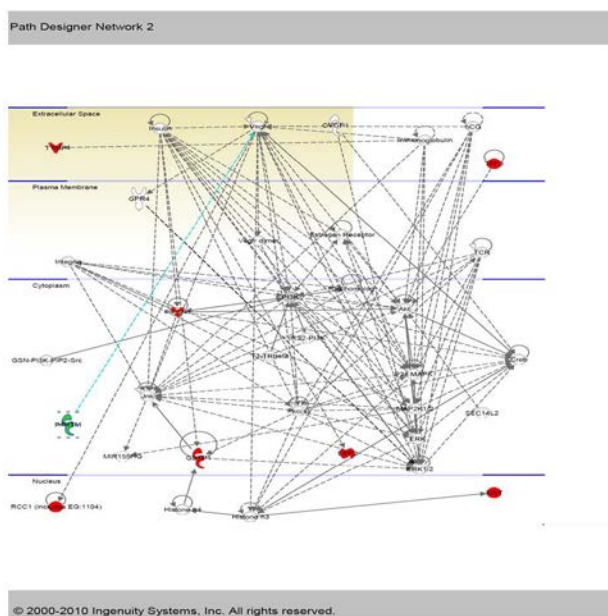


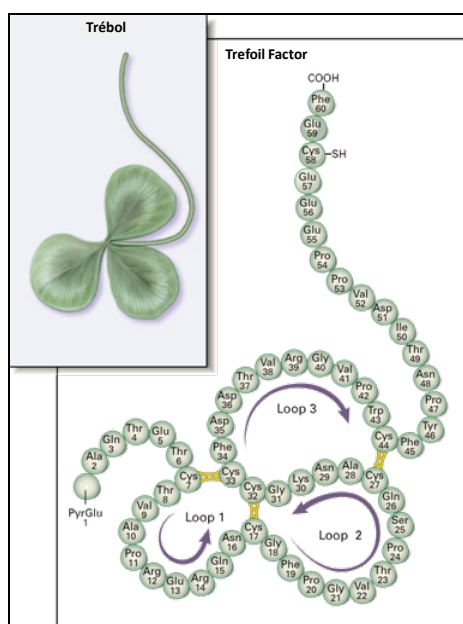
Figura 48 Red de Señalización 2



### 5.3.2 Regulación de TFF3 como factor pronóstico

TFF3 es una proteína de secreción rica en cisteína que pertenece a la familia de los "trefoil factors" del inglés "factores en trébol" los cuales contienen al menos un dominio en trébol. Los dominios en trébol son un conjunto de 42-43 aminoácidos con tres residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuro, creando una estructura de tres hojas característica que puede verse en la figura 49 (425).

Figura 49 Estructura de TFF3



Existen tres "trefoil factors": TFF1 (antes llamado *secreted protein 2*, pS2), TFF2 (antes llamado *spasmolytic polypeptide*, SP) y TFF3 (antes llamado *intestinal trefoil factor* - ITF). Los genes de los tres están localizados en una región de 50Kb en el cromosoma 21q22.3 (426, 427). Mientras TFF1 y TFF2 se expresan predominantemente en el estómago (ambos) y el colon (TFF1), TFF3 se expresa en todo el tracto digestivo - más en el colon que en el estómago - y también en el epitelio respiratorio (428). Otros tejidos en los que se ha descrito la presencia de TFF3 son endometrio, páncreas, vías biliares e incluso cerebro (429-433). La función normal de

los TFF's es tanto la protección de la mucosa frente a los estímulos nocivos como la reparación tras un daño en el epitelio (434). Estos efectos han sido generalmente atribuidos a la capacidad de TFF3 de estimular la capacidad de restitución de la mucosa, potenciando la proliferación y migración celular a las zonas dañadas (435).

Mashimo et al (436) crearon un modelo murino incapaz de expresar TFF3. Estos ratones se desarrollaron normalmente y eran inicialmente indistinguibles de los ratones control. Sin embargo, las células del colon de los ratones *Tff3*<sup>-/-</sup> eran incapaces de migrar correctamente a través de las criptas intestinales. Tras la administración de un irritante intestinal (dextrán sulfato sódico - DSS), los ratones *Tff3*<sup>-/-</sup> presentaron intensa diarrea y muchos de ellos fallecieron por una pancolitis sin evidenciarse una correcta cicatrización de la mucosa en la necropsia. Por otro lado, la administración endoluminal de *Tff3* recombinante restituía la capacidad de reparación de la mucosa lo cual confirmaba que estas alteraciones eran debidas a la ausencia de *Tff3*.

La regulación de la expresión de TFF3 no es del todo bien conocida. Numerosos estudios de expresión han demostrado que el factor de transcripción GATA-6 (que controla el desarrollo intestinal) regula TFF1 y TFF2, pero no ejerce efecto sobre TFF3 (437) mientras que HNF-3 (*hepatocyte nuclear factor 3*) activa la expresión de los tres genes (TFF1, 2 y 3) (438). Además, el *upstream stimulating factor* (USF) es un factor de transcripción que se une a la región promotora (E box) encontrada en los tres genes que, sin embargo, actúa en menor medida en TFF1 y 3 (439). Las citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y IL6 (actuando mediante los factores de transcripción NF $\kappa$ B y C/EBP $\beta$ ) inhiben la transcripción de TFF3 (440, 441). También, la región promotora 5' de TFF3 contiene elementos de respuesta a hormonas esteroideas relacionadas con el propio

desarrollo endometrial donde también se encuentra expresado TFF3 (442). La hipoxia también juega un papel regulador en la expresión de TFF3 dado que presenta una región de unión a HIF1 $\alpha$  en su promotor (443). Por último cabe destacar la regulación epigenética de TFF3 ya que, en los tejidos en los que no se expresa, su promotor se encuentra frecuentemente metilado (444).

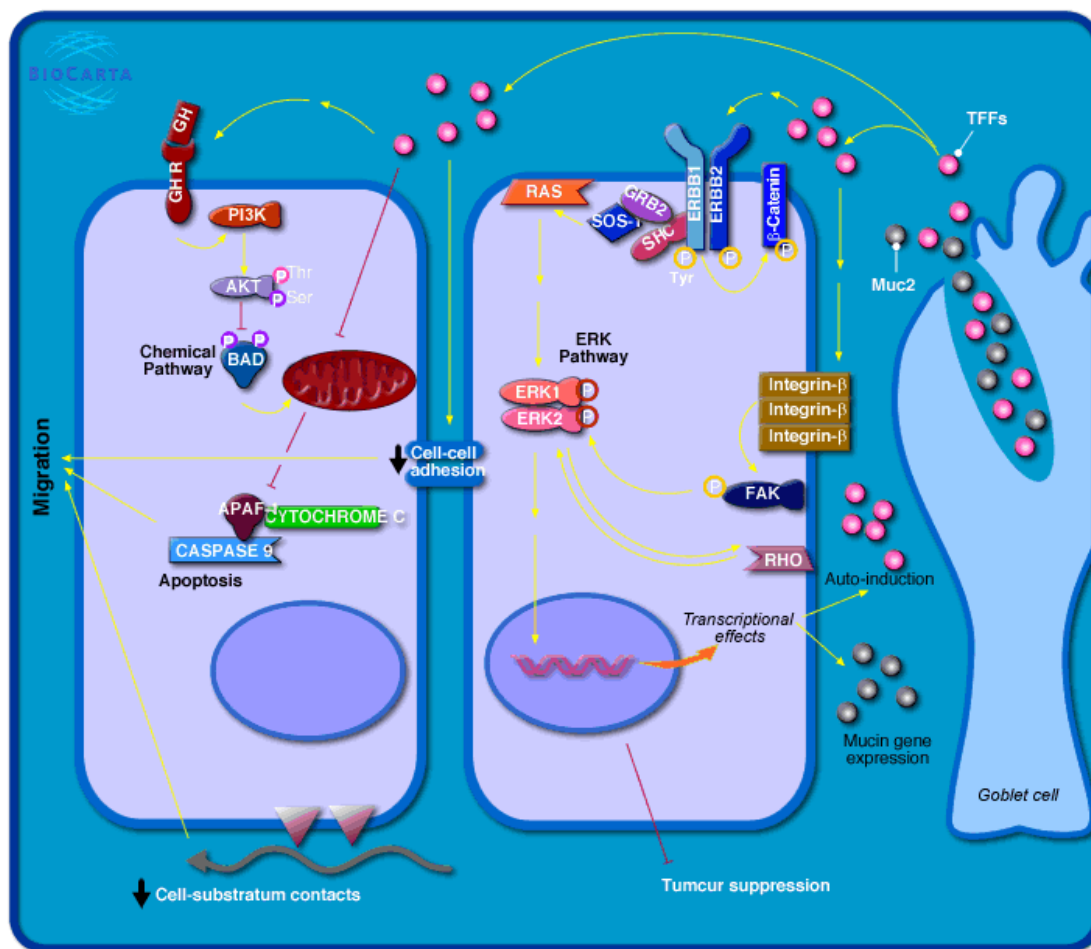
**Tabla 19 Funciones Celulares de TFF3**

<b>Diferenciación</b>	Aparición precoz en intestino en desarrollo	(446) (447)
	Diferenciación epitelio respiratorio	
<b>Protección Mucosa</b>	Coexpresión con mucinas.	(448) (449)
	Disminuye lesión mucosa tras agentes irritantes.	(450) (451) (452)
	Expresión en tejido linfoide	(453)
<b>Migración celular</b>	Activación vía PKC,EGFR/ERK, beta catenina	(454, 455) (456) (457) (458)
<b>Supervivencia Celular</b>	Vía MAPK, PI3K-Akt y NfKB.	(459) (460) (461)
<b>Motilidad Celular</b>	PI3K, PLC, PKC, mTOR, COX, TXA2, IL6/STAT3, internalización de E-cadherina.	(462, 463) (464) (465) (466)
	Interfiere con la función de las "adherens junctions"	
<b>Proangiogénico</b>	Formación de estructuras tubulares en modelos de células endoteliales de vena umbilical. Activación de STAT3. Estímulo síntesis de Oxido Nítrico. Estimula la secreción de VEGF	(467) (468) (469) (470)

Los efectos de TFF3 fisiológicos son ejercidos mediante su co-secreción con las mucinas en la luz intestinal contribuyendo a formar la capa mucosa de protección, pero por otro lado interactúa con receptores específicos de la superficie celular con actividad tirosin-kinasa (445). No se conoce con exactitud el receptor específico de TFF3 aunque se ha visto que se une a una glicoproteína de membrana de 50kDa presente en criptas intestinales y células de la mucosa gástrica. Los efectos celulares se resumen en la tabla 19

Las vías de señalización intracelular principales son AKT/mitogen-activated protein kinases (MAPK), STAT3 y PI3K como puede verse en la figura 50. Los estudios *in vitro* con células HT-29 y HCT166 demuestran que la adición de TFF3 produce incremento en la fosforilación de EGFR y AKT y esto conlleva resistencia a la apoptosis. Estos efectos además se revertían con wortmannin, un inhibidor de PI3K (336, 471). En el estudio de Kinoshita y cols. (459) la adición de la proteína truncada mediante mutaciones que afectaban al dominio en trébol evitaba la fosforilación de EGFR, mientras que la adición de la proteína nativa producía la reactivación de esta vía. Otra de las vías de señalización importantes es STAT3. En un trabajo con la línea celular de CCR HCT8/S11 Rivat y cols (468) demostraron que TFF3 aumenta la transcripción de STAT3 de forma significativa y que el bloqueo de la fosforilación de STAT3 es capaz de inhibir el potencial invasivo de las células tratadas con TFF3 recombinante. Además, en los modelos de ratón xenoinjertados con estas células, los tumores se reducían de forma considerable cuando eran tratados con un inhibidor de STAT3 (cucurbitacin). No se conoce si la importancia de STAT3 es consecuencia de la activación canónica de la vía o si se produce como consecuencia indirecta de la activación de las vías de las MAPK y mTOR ya que STAT3 también es un factor de transcripción implicado en estas dos vías de proliferación celular.

Figura 50 Señalización de TFF3



Las acciones antiapoptóticas y de motilidad celular de TFF3 han hecho que haya sido ampliamente estudiado en carcinogénesis. Uno de los cánceres que más ha sido relacionado con TFF3 es el adenocarcinoma gástrico. La positividad de TFF3 por inmunohistoquímica ha demostrado ser un factor de mal pronóstico en ese contexto, detectándose positividad en aproximadamente el 50% de los casos (472-474). Su expresión también se ha encontrado incrementada en carcinoma ductal y lobulillar de mama correlacionándose con el pronóstico, en tumores con receptores de estrógeno negativos (475-477). Otros cánceres en los que se ha encontrado expresión de TFF3 son próstata (478-480) pulmón (481), colangiocarcinoma (482, 483), tiroides (484) y hepatocelular (485, 486).

En modelos *in vitro* de adenocarcinoma colorrectal, TFF3 promueve la agresividad y progresión (487). En células de CCR metastásico se ha visto que la inhibición de TFF3 con siRNA reduce el potencial invasivo entre el 44 y el 74% (488). Efstathiou y cols (489) observaron que la adición de TFF3 recombinante a células de CCR (HT29, HCT116 y SW480) producía la des-adhesión intercelular con disminución de la expresión de E-cadherina. Estos efectos eran abolidos con la administración de tirfostina, un inhibidor competitivo de PKC.

A pesar de la innegable evidencia de que TFF3 es un gen importante en el desarrollo del CCR, no existían apenas estudios con muestras clínicas. En el año 2007 John y cols (490) publicaron sus resultados del análisis de la

expresión de TFF3 mediante IHQ en la serie mucosa normal de colon - adenoma - carcinoma. Encontraron que la expresión caía en los pólipos adenomatosos pero que se recuperaba en adenomas vellosos y adenocarcinomas. Curiosamente, su expresión se correlacionaba de forma inversa con la proliferación celular medida mediante el análisis de la expresión de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). La importancia de TFF3 en el cáncer de recto quedó en evidencia en el trabajo anterior de nuestro grupo, donde este gen era uno de los 13 genes que formaban parte del predictor de respuesta y supervivencia (5). El hecho de que fuera uno de los genes encontrados de forma "ciega" mediante el cribado completo del transcriptoma por SAGE, aumenta la seguridad de que este hallazgo no haya sido fruto del azar estadístico. En nuestra serie de pacientes, tras analizar la expresión de TFF3 mediante qPCR se observaba que aquellos pacientes con sobreexpresión tras la QTRT tenían peor pronóstico. Posteriormente, confirmamos estos resultados mediante inmunohistoquímica, lo cual apoya los resultados y abre la capacidad de aplicación clínica, ya que se trata de una técnica implementada en todos los laboratorios de anatomía patológica. Hay que resaltar que el mero valor de expresión de TFF3 en la biopsia pre-tratamiento no confería información pronóstica. Es decir, se requería la información conjunta de los 13 genes. En el presente trabajo, sin embargo, el cambio en la expresión de TFF3 es suficiente para asignar al paciente un grupo pronóstico. Esto implica que la expresión de TFF3 en la biopsia no es útil para conocer el pronóstico del paciente. Este sin embargo estará determinado por la evolución dinámica de la expresión de TFF3 tras el tratamiento QTRT o con la mera secreción glandular positiva de TFF3 tras el tratamiento. En este contexto cabe pensar que los pacientes que obtengan una respuesta patológica completa serán de muy buen pronóstico, los pacientes sin respuesta completa y con menor expresión de TFF3, de

pronóstico intermedio, y los pacientes sin respuesta completa y elevación en la expresión de TFF3, de mal pronóstico. El patrón de tinción IHQ hace pensar que quizás TFF3 esté señalizando de forma paracrina a células contiguas promoviendo la invasividad y capacidad de metástasis.

### 5.3.3 Estudio funcional de TFF3 *in vitro*

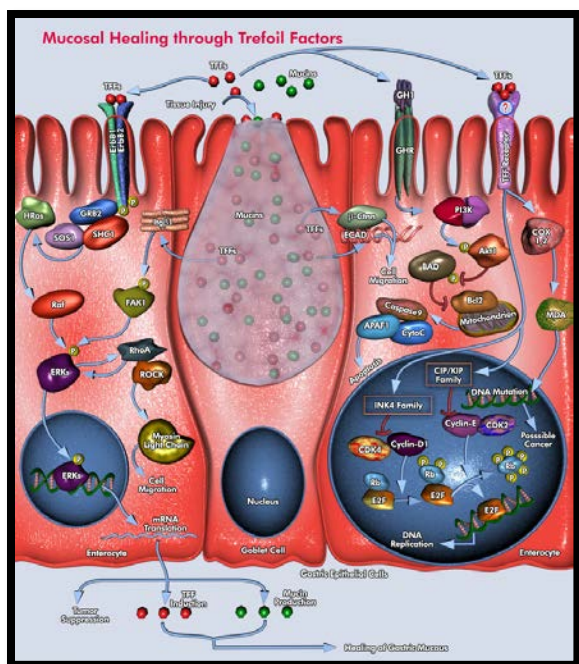
Ante los resultados pronósticos de TFF3 en muestras clínicas de pacientes con CCR, nos propusimos estudiar más a fondo el valor de la expresión de TFF3 en células de adenocarcinoma colorrectal. Las diez líneas celulares estudiadas (COLO201, HCT116, HT29, LoVo, RKO, SW480, SW620, T84, WiDr, y DLD1) son las más frecuentemente utilizadas en los estudios *in vitro* de CCR. No se encontró expresión basal en ninguna de las diez células. Estos resultados concuerdan con los de la mayoría de los autores. El primer autor que analizó la expresión de TFF3 en células de CCR fue Podolsky y cols. en 1993 (430). Comprobaron que las células CaCo2 no expresaban de forma basal mRNA de TFF3 y que las células HT29 tampoco. Sin embargo los subclones de HT29 N2 y H2, que presentan diferenciación caliciforme, sí expresaban TFF3. Estudios posteriores con células HT29 han utilizado por tanto transfección con vector (460) o estimulación con TFF3 recombinante (458, 459). En un estudio posterior, Durual y cols (336) observaron que la expresión de TFF3 en células HT29 podía inducirse seleccionándolas con metotrexato, aunque no aparecía hasta pasado el 3<sup>er</sup> día con un pico máximo de expresión en el día 34. Baus Loncar y cols. obtuvieron expresión mediante cultivo con TNF $\alpha$  a dosis intermedias (20 ng/mL). En nuestro estudio, sin embargo, no se observó expresión tras cultivo con 5FU, aunque la expresión no se midió más allá de 48 horas. La transfección pCMV-TFF3 resultó satisfactoria



(Figura 43A) y como cabía esperar, las células transfectadas resultaron más resistentes al tratamiento con 5FU (Figura 43B). En nuestro conocimiento, no existen estudios similares en la literatura, por lo que resulta difícil interpretar con exactitud estos resultados. Existe sin embargo cierta plausibilidad biológica que ayuda a explicar estos resultados si tenemos en cuenta los estudios previos que apoyaban la función de estímulo en las vías de supervivencia celular como EGFR y PI3K por TFF3.

Para conocer en detalle la implicación de la sobreexpresión de TFF3 en la célula de carcinoma colorrectal, realizamos un análisis de genoma completo comparativo en células DLD1 con y sin sobreexpresión de TFF3. Como se ha comentado en la sección 4.6 las células transfectadas con TFF3 tenían de forma significativa mayor expresión de genes relacionados con la activación transcripcional. En la figura 51 puede verse un resumen de las vías de señalización utilizadas por TFF3.

Figura 51 Restitución Mucosa Mediada por TFF3



La activación de las vías de proliferación era algo conocido como se ha comentado en la

sección 5.3.2. En nuestro experimento *in vitro*, interesantemente, el gen que más se modificó fue CSH1 (somatotropina coriónica). Esta proteína es conocida por su secreción durante la placenta en el embarazo. Los estudios *in vitro* han demostrado que ejerce acciones antiapoptóticas mediante estimulación de la vía PI3K/AKT y JAK/STAT (491). Esta relación era desconocida hasta la fecha, y será interesante un estudio más pormenorizado de las posibles relaciones de estas dos proteínas implicadas en la supervivencia celular. El segundo gen que más se sobre-expresó en las células con TFF3 inducido fue GINS4 (subunidad 4 del complejo GINS o Sld5). El complejo GINS es un componente de la helicasa de replicación que estimula la acción de las DNA-polimerasas  $\alpha$  y  $\epsilon$  (492). La acción de este complejo proteico compuesto por las proteínas Sld5, Psf1, Psf2, y Psf3, resulta imprescindible para la replicación celular y su inhibición provoca el retraso en la síntesis de DNA y del ciclo celular secundariamente.

El tercer gen más diferencialmente expresado fue ID1 (*Homo sapiens inhibitor of DNA binding 1*) incrementado 1,75 veces en células con TFF3 sobre-expresado. Este gen forma parte de los *inhibitors of DNA binding proteins* (ID's), familia de factores de regulación transcripcional con dominio hélice-lazo-hélice (HLH) de reconocido papel en desarrollo, senescencia, diferenciación, angiogénesis y migración (493). El papel clave de estas proteínas está en que controlan la auto-renovación de las células stem embrionarias, donde su sobre-regulación por BMP4 (*Bone morphogenic protein 4*). es imprescindible para mantener la capacidad de auto-renovación y pluripotencia (494). Existe evidencia de que las proteínas ID están sobre-expresadas en algunos cánceres como páncreas, ovario, próstata, mama y colon. Recientemente O'Brien y cols (495) han demostrado que las células iniciadoras del cáncer, seleccionadas por antígenos de superficie tipo CD133 o CD44

tienen mayor expresión de ID1. Los modelos celulares con knock-down de ID1 perdían la capacidad de ser células iniciadoras del cáncer, siendo incapaces de realizar la división asimétrica, esencial para las células que tienen esta característica. Sus resultados además sugerían que estas acciones eran mediadas por el efecto inhibitor de ID1 sobre p21 (efector de p53, inhibidor del ciclo celular) tanto de forma directa como indirecta vía inhibición de la expresión de PTEN que se recuperaba en los modelos *knock-down*. Resulta por tanto interesante que TFF3 promueva la expresión de ID1 ya que en situaciones de daño celular se requerirá una activación del ciclo celular para la restitución de la mucosa. Esto resultará un arma de doble filo en células transformadas en las que se activará la vía PI3K por inhibición de PTEN y la entrada de la célula en la fase S del ciclo celular.

Otro de los hallazgos interesantes de nuestro trabajo ha sido la infra-expresión de NANOS-1 (-1,6x). Este gen codifica una proteína implicada en la invasión celular, que está habitualmente reprimida por la expresión de E-cadherina (496). Cuando se produce una inhibición en la expresión de E-cadherina, se produce un incremento de la expresión de NANOS1, que induce a su vez un aumento de expresión de MMP (*matrix metalloproteinases*), por lo que la célula adquiere la capacidad de penetrar en los tejidos degradando la matriz extracelular (497). La expresión de proteínas implicadas en la comunicación intercelular por contacto como E-cadherina en células *in vitro* está no sólo regulada por las cascadas de señalización citoplasmáticas, sino también por el propio contacto celular. Resulta, por tanto, complicado sacar conclusiones en este aspecto con células en cultivo cuyo comportamiento por contacto es totalmente diferente al que presentarán al encontrarse en tejidos ya sea orto o heterotópicamente. La expresión de SIP1 (*Survival of motor neuron protein-interacting protein 1*) sin embargo sí que aparecía

incrementada en las células con inducción de TFF3. Esto se encuentra en consonancia con los resultados de otros tipos celulares como en modelos de carcinoma epidermoide de orofaringe donde se encuentra inversamente relacionado con la expresión de E-cadherina (498). La proteína codificada por este gen es un componente fundamental del complejo SMN (*survival of motor neurons*) el cual es el encargado del procesamiento de los snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) los cuales se encargarán del procesado de los pre-mRNA. La sobre-expresión de este gen, junto con otros relacionados con la activación transcripcional y procesamiento de RNA como *splicing factor*, *ribosomal protein S6 kinase*, *mediator of RNA polymerase II transcript*, implica un aumento de la utilización de la maquinaria celular para la síntesis proteica secundario al único estímulo diferenciador de la expresión de TFF3.

Como consecuencia de la sobre-expresión de TFF3 y del aumento secundario en la transcripción, se observa también una sobre-expresión de la proteína SCAMP1 (*secretory carrier membrane protein 1*) encargada de la exocitosis de gránulos de secreción (499). Como se ha comentado, la secreción de TFF3 al espacio extracelular se realiza de forma conjunta con las mucinas MUC2, MUC5A Y MUC6 (500). Estas mucinas constituyen la capa de protección mucosa de las células intestinales por lo que la sobreexpresión de SCAMP1 será imprescindible para que los gránulos de secreción sean exocitados de forma correcta. Este hallazgo, resulta novedoso ya que no se conocen con exactitud los mediadores del tráfico intracelular de TFF3.

Otra de las relaciones interesantes desveladas en el estudio de expresión *in vitro* ha sido la regulación de survivin (BCIRG5) por TFF3. Survivin es una proteína antiapoptótica que ha sido ampliamente estudiada en CCR. Fue descubierta en 1997 y cobró rápidamente importancia al observarse que se encontraba



sobre-expresada en prácticamente todos los cánceres humanos (501). La importancia de esta proteína radica en que es un regulador esencial de la división celular, un modulador de la muerte tanto apoptótica como no apoptótica y factor de respuesta al estrés celular que asegura la proliferación en ambientes adversos para la célula. Una de las características fundamentales de survivin es la cantidad de moléculas reguladoras y redes de transcripción que están implicadas en sus funciones. Regula dos redes principalmente: división celular y muerte celular. Puede verse el esquema de sus relaciones en la muerte celular en la figura 52 (502). La conexión de survivin con ambas redes es extremadamente flexible, ya que conecta múltiples vías de señalización implicadas en la homeostasis celular totalmente independientes entre sí. La interferencia con survivin en cultivos celulares sincronizados, suele finalizar en una forma de apoptosis celular llamada catástrofe mitótica. Sin embargo, también se cree que tiene importancia en la interfase celular, ya que las células tumorales suelen expresar altos niveles de expresión de survivin durante todo el ciclo

celular (503). Los estudios con muestras tumorales procedentes de pacientes con cáncer de recto tratado con quimio-radioterapia neoadyuvante, han puesto de manifiesto que esta proteína juega un papel importante en este contexto. El primer trabajo, publicado en 2004, analizó la expresión de survivin en la pieza quirúrgica de 98 pacientes operados, 41 de ellos con radioterapia neoadyuvante. Aproximadamente, el 50% de los tumores presentaban inmunotinción positiva y esos pacientes tenían una tendencia a una menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, independientemente de la terapia recibida (504). Posteriormente, Rödel y cols, publicaron en 2005 un trabajo en el que mediante el silenciamiento de survivin con siRNA revertían la radioresistencia de las células de CCR SW480. Además, en el estudio de 59 pacientes tratados con QTRT neoadyuvante, aquellos pacientes con inmunotinción positiva en la biopsia preoperatoria, presentaban una tasa de recaída significativamente mayor (26% vs. 5%) (271).

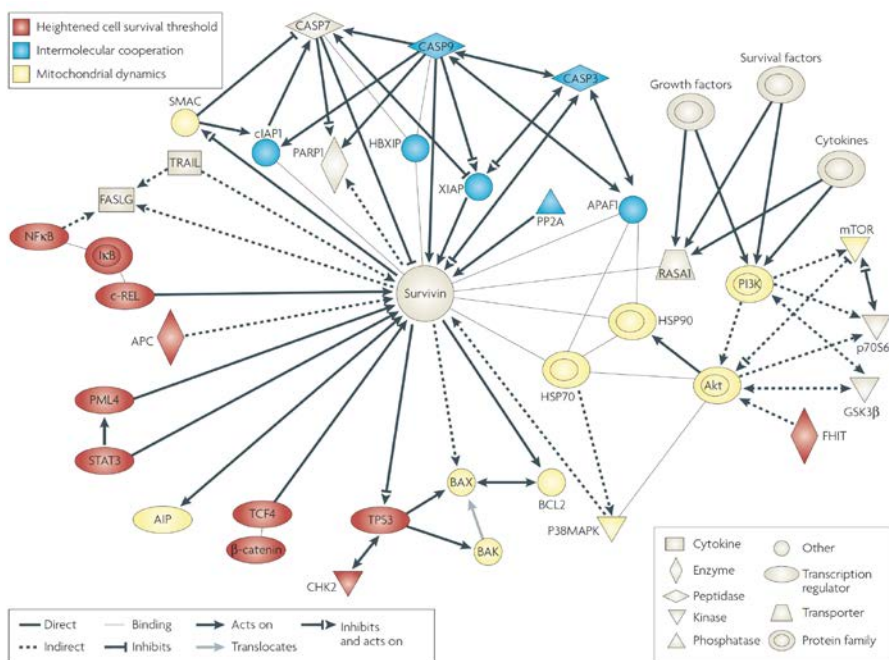


Figura 52 Relación de Survivin con la muerte celular.

Posteriormente, ese mismo grupo, comunicó los resultados de un estudio en el que realizaron un análisis dinámico de la expresión de survivin mediante IHQ antes y después del tratamiento neoadyuvante (272). Sus hallazgos resultaron concordantes con los anteriores, una expresión positiva en la biopsia se correlacionaba con una T más avanzada (menor respuesta por lo tanto), además de una peor SLE. Observaron que aquellos pacientes cuya expresión no se reducía como consecuencia del tratamiento (comparando expresión en biopsia con expresión en pieza de resección) presentaban una alta probabilidad de desarrollar metástasis y fallecer por cáncer. En nuestra serie, aunque no se analizó la expresión de survivin mediante IHQ, los resultados de expresión de RNA son coincidentes, y se observa que tras la QTRT existe una infra-expresión de survivin que resultó cercana a la significación estadística [CAMBIO DE EXPRESIÓN (pieza-biopsia): -1.897 fold change ( $p=0.06168$ )]. No obstante, en nuestros resultados, survivin no resultaba ser un factor pronóstico relevante tras la QTRT. Resulta por tanto intrigante que la sobre-expresión de TFF3 en células DLD1 induzca una infra-expresión de un factor anti-apoptótico tan importante. Esto podría significar que los hallazgos de Sprenger y cols, no sean debidos directamente a la acción de la RT como inhibidor de la expresión de survivin, si no a la inducción que se puede producir por el tratamiento sobre TFF3 (aumento de expresión) y la acción secundaria inhibitoria de esta sobre survivin. Dado que survivin es una proteína de suma importancia en la supervivencia de la célula tumoral, este hallazgo abre una puerta a un nuevo campo de investigación acerca de la relación de estas dos proteínas.

El resto de genes regulados por TFF3 tuvieron una variación menor del 30% aunque estadísticamente significativa (tabla 18). Forman parte de diversos mecanismos de regulación celular como síntesis proteica (chaperona DNAJ/HSP40), regulación de la transcripción

(ARID4B), glicosilación proteica (GALANT12), DNA helicasas (C10Orf2), reparación de daño al DNA (PARP8), e incluso otros reguladores de la apoptosis celular menos conocidos como MOAP1.

### 5.3.4 Implicaciones futuras de los resultados

---

Este trabajo de investigación culmina la segunda parte de un amplio proyecto: caracterizar en primer lugar la expresión génica basal del cáncer de recto, encontrando un perfil pronóstico (Tesis de la Dra. Blanco)(5) y en segundo lugar la expresión génica después del tratamiento señalando una potencial diana terapéutica: TFF3 (505). Estos hallazgos son por tanto el comienzo de una investigación aún más ambiciosa: determinar el valor de TFF3 como posible método de detección precoz y en segundo lugar estudiar el papel terapéutico de inhibidores de TFF3.

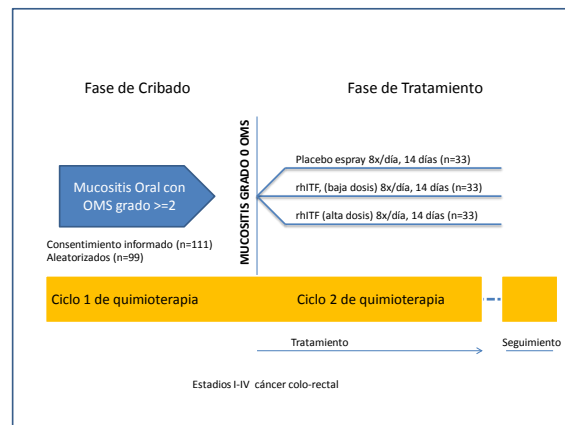
La posibilidad de utilizar TFF3 como marcador tumoral surge de diversos estudios recientes. Se han encontrado altos niveles en suero de pacientes con cáncer de pulmón (481), cáncer de endometrio (506) y cáncer de próstata (507). Aunque lógicamente en tumores digestivos ha resultado de mayor utilidad con varios estudios avalando su uso en cáncer gástrico tanto solo como en combinación con los niveles de pepsinógeno sérico (508, 509). Los niveles séricos de TFF3 no han sido medidos en pacientes con CCR hasta la fecha. Curiosamente un estudio comparativo entre las proteínas de secreción de dos líneas celulares emparentadas, aunque diferenciadas por provenir de un tumor primario de colon (SW480) o de la metástasis linfática (SW620), encontró que una de las proteínas que más se diferenciaban era TFF3 (337). En pacientes con cáncer de colon existe evidencia de que las células tumorales circulantes expresan mRNA de TFF3 (510). Sin

embargo la realización de forma rutinaria de una RT-PCR es poco realista, por lo que nuestro grupo está trabajando actualmente en la detección de TFF3 en suero en pacientes con CCR mediante ELISA para evaluar su posible valor como método de detección precoz y/o seguimiento de la enfermedad.

En segundo lugar su potencial valor como diana terapéutica debe ser caracterizado de forma cuidadosa. Como se comentó en la sección 4.5, las células DLD1 con inducción de TFF3 resultaron más resistentes al tratamiento con 5FU que las células con vector vacío [IC50 105,6 (+/-77,98)  $\mu\text{mol/L}$  vs. 43,6 (+/-36,23)  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente]. Desde el punto de vista molecular este hallazgo no resulta sorprendente tras haber analizado la capacidad de TFF3 de inducir la expresión de genes de supervivencia y reparación del daño genómico. Este resultado, además está en concordancia con los publicados por Chan y cols. en células de cáncer gástrico. En su experimento, el bloqueo de la expresión de TFF3 mediante un oligonucleótido antisentido, producía una mayor sensibilidad de las células SNU-1 al tratamiento con adriamicina (511).

Cabe inferir, que la inhibición de TFF3, tanto de forma directa, como indirectamente por una de sus vías de señalización, podría ser útil en la terapia de pacientes con tumores "TFF3 positivos". Habría que tener en cuenta en ese contexto la pérdida de capacidad de reparación de la mucosa sana. De hecho el TFF3 recombinante humano (rhITF) se ha utilizado a modo de spray oral para prevenir la mucositis producida por quimioterapia. En un ensayo clínico fase II controlado con placebo, se aleatorizaron pacientes con CCR en tratamiento con quimioterapia que habían desarrollado mucositis a recibir rhITF a dosis bajas, altas o placebo (Figura 53).

Figura 53 Diseño del Estudio Fase II con rhITF



La eficacia en la prevención de un segundo episodio de mucositis oral fue significativa con una frecuencia del 48% para los pacientes con placebo y del 9% al 12% para los pacientes con tratamiento a bajas y altas dosis respectivamente (512). Los autores resaltan la importancia de que este tratamiento sea administrado de forma tópica como spray oral. Consideran que la administración sistémica podría tener efectos deletéreos, promoviendo el crecimiento tumoral. De hecho aportan esta ventaja sobre otro tratamiento utilizado en esta patología, palifermin, un factor estimulante de keratinocitos usado habitualmente para tratar mucositis severas en pacientes con quimioterapia a altas dosis como adecuación al trasplante de progenitores hematopoyéticos. Este se administra de forma sistémica y aunque ha demostrado reducir la incidencia de mucositis en pacientes con CCR en tratamiento quimioterápico, su uso no se ha generalizado por la relativamente baja incidencia de esta complicación y las dudas acerca del efecto de esta terapia sobre la enfermedad (513).

Cabe por tanto pensar, que una supuesta terapia con inhibidores directos de la acción de TFF3 en combinación con quimioterapia produciría una elevada incidencia de mucositis, por lo que el diseño experimental del ensayo clínico de fase I resultará crucial en el desarrollo del inhibidor.

No obstante el mero hecho de disponer de un "antídoto" a la terapia - la administración de rhITF de forma local tanto en espray como en enemas - supondría una ventaja ante las posibles complicaciones.

# CONCLUSIONES

## *CONCLUSIONS*

---



---

## 6. CONCLUSIONES

---

1. La administración de quimio-radioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de recto en estadio II o III provoca la modificación de la expresión de genes relacionados con el control del ciclo celular, proliferación, apoptosis, de radicales libres e hipoxia y reguladores del proceso metastásico.
2. El estadio patológico, los niveles séricos de antígeno carcinoembrionario y el grado de regresión tumoral tienen correlación pronóstica tras el tratamiento con QTRT.
3. La sobreexpresión génica de TFF3 en el adenocarcinoma de recto tras el tratamiento con QTRT confiere un mayor riesgo de recaída y muerte por cáncer, independientemente de otros factores pronósticos.
4. La detección de TFF3 mediante IHQ en las piezas quirúrgicas de pacientes intervenidos de adenocarcinoma de recto tras QTRT es un factor de mal pronóstico independiente.
5. Las células de adenocarcinoma colorrectal humano DLD-1 con inducción de TFF3 son más resistentes al tratamiento con 5FU por lo que tanto esa proteína como su vía de transducción representan una potencial diana terapéutica.

---

## CONCLUSIONS

---

1. Administration of neoadjuvant chemoradiotherapy to patients with stages II and III rectal cancer induces changes to the expression of genes involved in cell cycle, proliferation, apoptosis, control of free radicals, hypoxia and regulators of metastatic process.
2. The pathologic stage, serum carcinoembryonic antigen levels and tumor regression grade have prognostic value after treatment with chemoradiotherapy.
3. The upregulation of TFF3 after chemoradiotherapy is an independent prognostic factor for relapse and death.
4. TFF3 positivity by immunohistochemistry in surgical specimens of rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy is a poor prognostic factor.
5. DLD-1 colorectal cancer cells with TFF3 induction show resistance to 5FU in vitro pointing to a potential therapeutic target by inhibiting its function or its signaling cascade.





# APÉNDICE

---



## 7. APÉNDICE

### 7.1. Artículos Publicados Relacionados con la Línea de Investigación en Revistas Internacionales.

	Páginas
<b>Upregulation of Trefoil Factor 3 (TFF3) after rectal cancer chemoradiotherapy is an adverse prognostic factor and a potential therapeutic target.</b>	<b>123-130</b>
<i>Casado E*, García VM*, Sánchez JJ, Gómez del Pulgar MT, Feliu J, Maurel J, Castelo B, Moreno-Rubio J, López R, García-Cabezas MA, Burgos E, de Castro J, Belda C, López-Gómez M, Gómez-Raposo C, Zambrano F, Sereno M, Fernández-Martos C, Vázquez P, Lacal JC, González-Barón M, Cejas P.</i>	
* Both authors contributed equally.	
<b>International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. 2012. Apr 18</b>	
<b>A combined strategy of SAGE and quantitative PCR provides a 13-gene signature that predicts preoperative chemoradiotherapy response and outcome in rectal cancer</b>	<b>131-141</b>
<i>Enrique Casado*, Víctor Moreno García*, Jose Javier Sánchez, Montserrat Blanco, Joan Maurel, Jaime Feliu, Carlos Fernández-Martos, Javier de Castro, Beatriz Castelo, Cristóbal Belda, María Sereno, Benito Sánchez-Llamas, Emilio Burgos, Miguel Ángel García-Cabezas, Noemí Manceñido, Rosa Miquel, Damián García-Olmo, Manuel González-Barón, Paloma Cejas.</i>	
* Both authors contributed equally.	
<b>Clinical Cancer Research. 2011 Apr 5.</b>	
<b>Immunohistochemical analysis of tumour regression grade for rectal tumors after neoadjuvant chemoradiotherapy.</b>	<b>143-152</b>
<i>Víctor Moreno García; Enrique Casado; Jaime Feliu Batlle; Emilio Burgos; Javier de Castro; Cristóbal Beld; Jorge Barriuso; Jose Javier Sánchez; Miguel Ángel García-Cabezas; Manuel González-Barón; Paloma Ceja).</i>	
<b>Colorectal Disease. 2011 Sep;13(9):989-98.</b>	
<b>Prognostic Value of Carcinoembryonic Antigen Level in Rectal Cancer Treated With Neoadjuvant Chemoradiotherapy</b>	<b>153-160</b>
<i>Moreno García V, Cejas P, Blanco M, Feliu J, Castro J, Belda C, Barriuso J, Sanchez JJ, Gonzalez Baron M.</i>	
<b>International Journal of Colorectal Diseases. 2009 Jul;24(7):741-8</b>	



## Biology Contribution

## Upregulation of Trefoil Factor 3 (TFF3) After Rectal Cancer Chemoradiotherapy Is an Adverse Prognostic Factor and a Potential Therapeutic Target

Enrique Casado, MD,\* Victor Moreno Garcia, MD,<sup>†,‡</sup> Jose Javier Sánchez, PhD,<sup>¶</sup> María Teresa Gómez del Pulgar, PhD,\*\* Jaime Feliu, MD,<sup>†,‡</sup> Joan Maurel, MD,<sup>††</sup> Beatriz Castelo, MD,<sup>†</sup> Juan Moreno Rubio, PhD,<sup>‡</sup> Rocío A.B. López,<sup>‡</sup> Miguel Ángel García-Cabezas, MD,<sup>§</sup> Emilio Burgos, MD,<sup>§</sup> Javier de Castro, MD,<sup>†,‡</sup> Cristóbal Belda-Iniesta, MD,<sup>†</sup> Miriam López-Gómez, MD,\* César Gómez-Raposo, MD,\* Francisco Zambrana, MD,\* María Sereno, MD,\* Carlos Fernández-Martos, MD,<sup>‡†</sup> Pilar Vázquez, MD,<sup>||</sup> Juan Carlos Lacal, PhD,\*\* Manuel González-Barón, MD,<sup>†</sup> and Paloma Cejas, PhD<sup>‡\*</sup>

\*Unidad de Oncología, Hospital Infanta Sofía, Madrid, Spain; <sup>†</sup>Servicio de Oncología Médica, <sup>‡</sup>Laboratorio de Oncología Traslacional, <sup>§</sup>Departamento de Anatomía Patológica, and <sup>||</sup>Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>¶</sup>Departamento de Bioestadística, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; \*\*Unidad de Oncología Traslacional, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; <sup>††</sup>Departamento de Oncología, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; and <sup>‡†</sup>Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

Received Dec 23, 2011, and in revised form Jan 25, 2012. Accepted for publication Jan 28, 2012

## Summary

Elucidating the dynamic of pathway activation after treatment could help to identify rectal cancer patients who will benefit from preoperative and

**Purpose:** Management of locally advanced rectal cancer (RC) consists of neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) with fluoropyrimidines, followed by total mesorectal excision. We sought to evaluate the expression of selected genes, some of which were derived from a previous undirected SAGE (serial analysis of gene expression)-based approach, before and after CRT, to identify mechanisms of resistance.

**Methods:** This retrospective cohort study included 129 consecutive patients. Quantitative polymerase chain reaction of 53 candidate genes was performed on the biopsy specimen before treatment and on the surgical specimen after CRT. A paired-samples *t* test was performed to

Reprint requests to: Enrique Casado, MD, Unidad de Oncología, Hospital Universitario Infanta Sofía, Avenida de Europa 34, San Sebastián de los Reyes, Madrid 28072, Spain. Tel: (34) 618-398-170; Fax: (34) 911-915-388; E-mail: [enrique.casado@salud.madrid.org](mailto:enrique.casado@salud.madrid.org) or Paloma Cejas, PhD, Laboratorio de Oncología Traslacional, Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Paseo de la Castellana 261, Madrid 28046, Spain. Phone/fax: (34) 912071027; E-mail: [paloma.cejas@idipaz.es](mailto:paloma.cejas@idipaz.es)

Funded by Fondo de Investigaciones Sanitarias PI021094 and Fundación Mutua Madrileña. P. Cejas is supported by Asociación Española Contra el Cáncer programa PAO 2010, and V. M. García is supported by

Fundación Para la Investigación Biomédica del Hospital La Paz grant REX 09.

E. Casado and V. M. García contributed equally to this work.

Conflict of interest: none.

Supplementary material for this article can be found at [www.redjournal.org](http://www.redjournal.org).

**Acknowledgment**—The authors thank Esther Díaz and María de Miguel for outstanding technical support.

postoperative treatment. We present the dynamic expression of 53 genes, before and after preoperative chemoradiotherapy, in a series of 129 consecutive patients. We show that upregulation of TFF3 is associated with a higher risk of relapse, pointing to TFF3 as a novel prognostic marker and a candidate therapeutic target.

determine genes that were significantly changed after CRT. The result was correlated with patients' disease-free survival.

**Results:** Twenty-two genes were significantly upregulated, and two were significantly downregulated. Several of the upregulated genes have roles in cell cycle control; these include CCNB1IP1, RCC1, EEF2, CDKN1, TFF3, and BCL2. The upregulation of TFF3 was associated with worse disease-free survival on multivariate analyses (hazard ratio, 2.64;  $P = .027$ ). Patients whose surgical specimens immunohistochemically showed secretion of TFF3 into the lumen of the tumoral microglands had a higher risk of relapse (hazard ratio, 2.51;  $P = .014$ ). *In vitro* experiments showed that DLD-1 cells stably transfected with TFF3 were significantly less sensitive to 5-fluorouracil and showed upregulation of genes involved in the transcriptional machinery and in resistance to apoptosis.

**Conclusion:** Upregulation of TFF3 after CRT for RC is associated with a higher risk of relapse. The physiological role of TFF3 in restoring the mucosa during CRT could be interfering with treatment efficacy. Our results could reveal not only a novel RC prognostic marker but also a therapeutic target. © 2012 Elsevier Inc.

**Keywords:** TFF3, Rectal cancer, Neoadjuvant treatment, Response prediction, Prognosis

## Introduction

Colorectal carcinoma is one of the leading causes of cancer death worldwide, and rectal cancer (RC) accounts for 30%-35% of these cases (1). Approximately half of all RC cases are diagnosed in stage II or III, in which preoperative chemoradiotherapy (CRT), followed by total mesorectal excision, is currently the most accepted treatment. Preoperative CRT improves local control and reduces toxicity (2, 3) compared with postoperative CRT, but its impact on the patient's survival is unclear (4). Importantly, despite this treatment, distant metastases develop in one-third of patients (5). In addition, the local tumor response is highly variable, with 10%-15% of patients achieving a complete pathologic response and 15%-20% having no tumor response (2). Thus, there is an overwhelming need for new strategies that can overcome resistance to CRT and allow better customized therapy.

The reason for this variability in response is unknown. The variability could be partly explained by differences in the genetic background of the tumor and by the mechanisms of resistance acquired during treatment (6). A number of gene expression profiles obtained from pretreatment biopsy specimens have been developed with the aim of better identifying patients who are more likely to respond to the preoperative CRT (7-9). Although these models provide a valuable tool for selecting candidate patients for neoadjuvant treatment, they are not able to explain the molecular changes occurring within the tumor that might be responsible for treatment resistance. To this end, identifying RC markers that are altered in response to CRT could reveal new drivers of resistance and could provide tantalizing therapeutic targets to develop complementary treatments. We had previously conducted a small pilot study that dynamically evaluated the RC transcriptome by serial analysis of gene expression (SAGE) and found a small group of genes that are commonly regulated in patients who are refractory to CRT (10).

We sought to evaluate the differential expression of selected genes before and after CRT and to evaluate the impact of these changes in expression on patient prognosis, to identify potential

mechanisms of resistance to CRT, as well as novel therapeutic targets.

## Methods

### Patients

One hundred twenty-nine patients with RC were included in this study. Both pre-treatment biopsies and surgical specimens were histologically confirmed to be colorectal adenocarcinomas. Values for various clinical and pathological variables were retrospectively obtained from a database of information on patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer at Hospital Universitario La Paz in Madrid and Hospital Clinic of Barcelona (108 and 21 patients, respectively). All patients underwent flexible endoscopy with rectal biopsy and magnetic resonance imaging (MRI) and/or endoscopic ultrasound for clinical staging. A chest radiograph was obtained and abdominal and pelvic computed tomography was performed to exclude TNM stage IV tumors. Patients with clinical stage II or III disease were considered eligible for this study. In 7 cases with low rectal stage I disease, neoadjuvant CRT was given to avoid abdominoperineal amputation. All patients received concurrent CRT before surgery. Radiotherapy was uniform across all of the patients and consisted of 45 Gy followed by a boost of 5 Gy to the gross tumor volume and the mesorectum. Concurrent chemotherapy consisted mainly of fluoropyrimidines (5-fluorouracil [5-FU], Tegafur-Uracil (UFT)-leucovorin, and capecitabine) or oxaliplatin-based chemotherapy (raltitrexed-oxaliplatin or oxaliplatin-capecitabine). Surgery was performed 6-8 weeks after the completion of radiotherapy, and total mesorectal excision was routinely performed. Tumor regression grade (TRG) was assessed according to Dworak et al (11). Follow-up examinations were performed according to the National Comprehensive Cancer Network guidelines. Disease-free survival (DFS) was defined as the time from diagnosis to the first evidence of disease recurrence, either locally or as metastases. Overall survival (OS) was defined as the time from diagnosis to death or last follow-up.

A flowchart of patients is shown in Fig. E1 (supplementary material).

## Quantitative polymerase chain reaction analysis

Forty-two patients were excluded because of unsuitable pathologic samples or unsuccessful gene expression data, and a further 13 patients were excluded because they had pathologically complete responses. For the remaining 74 patients, over 75% tumor cell enrichment was ensured, when necessary, by subsequent macrodissection of the tissue block with the use of a safety blade and confirmatory hematoxylin-eosin staining of post-operative biopsy specimens. RNA was extracted from 10-15 5- $\mu$ m sections by use of a Masterpure RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was used for complementary DNA synthesis according to the protocol provided with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). TaqMan Low Density Arrays (TLDA) were designed to include genes from the previous SAGE undirected screen and from published literature (10). More details of the analysis are available in the supplementary material.

## Immunohistochemistry

Expression of TFF3 was evaluated in the surgical specimens by immunohistochemistry. Of the 116 surgical specimens, 82 showed an evaluable immunostaining. Sections with a thickness of 4  $\mu$ m were cut from Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) tissue array blocks. Slides were deparaffinized, and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 10 minutes at room temperature. Antigens were retrieved by incubation in EDTA for 45 minutes at 155°C. The primary monoclonal antibody against TFF3 (H00007033-M01; Novus Biologicals, Littleton, CO) was diluted 1:250 in 1% bovine serum albumin in Tris-buffered saline solution. Tissue slides were incubated with the TFF3 antibody for 30 minutes at room temperature. The slides were then rinsed in Tris-buffered saline solution and incubated with the peroxidase-based EnVision kit (Dako, Carpinteria, CA) for 30 minutes at room temperature. The TFF3 immunostaining was considered positive when TFF3 was expressed inside the lumen of the tumoral microglands (Fig. E3, supplementary material).

## Cell culture, constructs, and transfection

The human colorectal adenocarcinoma cell lines used in this study were obtained from the ATCC (Manassas, VA) and were cultured as described in the supplementary material. Transfections were performed with Lipofectamine Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) as directed by the manufacturer. We used pCMV6-neo-TFF3 (Origene Technology, Rockville, MD) plasmid DNA to stably express TFF3 in the DLD-1 cell line. More details on transfection and the cell proliferation assays are available in the supplementary material.

## RNA isolation, labeling, and hybridization to microarrays

RNA was isolated from the parental and TFF3-transfected DLD-1 cell lines by use of TRIzol reagent (Invitrogen) and QIAGEN RNeasy columns (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturers' instructions. The RNA was conjugated to Cy3 and Cy5 dyes (GE Healthcare Bio-sciences, Baie d'Urfé, Quebec,

Canada). The RNA concentration and dye incorporation were measured with a UV-VIS spectrophotometer (Nanodrop ND-1000; Agilent Technologies, Wilmington, DE). We used 44000 Whole Human Genome Microarray gene expression chips (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol. More details of the analysis are available in the supplementary material.

## Statistical analysis

The expression of each gene was measured in triplicate, and the average intensity in the TLDA was assessed. To reduce variation between TLDA, the intensity values by sample in each TLDA were rescaled by a quantile normalization method. Each intensity value was then log-transformed to a base-2 scale. Before analyzing quantitative polymerase chain reaction (qPCR) data, we normalized the results to the 3 most stable genes (GAPDH, B2M, and PMSB4). A paired-samples *t* test was performed to determine which genes showed significant changes in expression after CRT, and a 2-tailed *P* value of <.01 was considered statistically significant. More details of the analysis are available in the supplementary material.

## Results

One hundred twenty-nine patients were eligible for the study. The clinical and pathologic variables are summarized in Table 1. Of

**Table 1** Clinical and pathologic characteristics of 129 patients

Characteristic	Data
Median age (range) (yr)	65 (23-84)
Sex [No. of patients (%)]	
Male	71 (55)
Female	58 (45)
Clinical stage [No. of patients (%)]	
I	9 (7)
II	65 (50)
III	51 (39)
Unknown	4 (3)
Pathologic stage [No. of patients (%)]	
0	13 (10)
I	32 (25)
II	48 (37)
III	36 (28)
Tumor regression grade [No. of patients (%)]	
0/1	32 (25)
2	70 (54)
3	14 (11)
4	13 (10)
Surgery [No. of patients (%)]	
Low anterior resection	71 (55)
Abdominoperineal resection	54 (42)
Local excision	4 (3)
Concurrent chemotherapy* [No. of patients (%)]	
Fluoropyrimidine	71 (55)
Oxaliplatin based	58 (45)

\* Fluoropyrimidine includes 5-fluorouracil, UFT-leucovorin, and capecitabine. Oxaliplatin-based treatment was either oxaliplatin-capecitabine or oxaliplatin-Raltitrexed.

**Table 2** Genes with significantly changed expression after CRT ( $P < .01$ )

Gene symbol	UniGene	<i>t</i> Test	<i>P</i> Value	Description
Downregulated				
P4HTM	Hs00214665	−8.129	8.8E-12	Prolyl 4-hydroxylase
ITGB4	Hs00173995	−2.787	.006769	Integrin $\beta 4$
Upregulated				
FOS	Hs00170630	7.834	2.66E-11	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
HIG2	Hs00203383	6.651	4.59E-09	Hypoxia-inducible gene 2 protein
CDKN1	Hs00355782	6.282	2.07E-08	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
SPARC	Hs00234160	5.423	7.06E-07	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
DPYD	Hs00556278	5.170	1.92E-06	Dihydropyrimidine dehydrogenase
ALDH1A1	Hs00167445	5.166	1.95E-06	Aldehyde dehydrogenase 1A1
CKB	Hs00176484	4.264	5.93E-05	Creatine kinase B
PSMB6	Hs00382586	4.008	.000146	Proteasome subunit beta type 6
BCL2	Hs00153350	3.788	.000307	B-cell CLL/lymphoma 2
GSTP1	Hs00168310	3.738	.000366	Glutathione S-transferase pi 1
RCC1	Hs00154399	3.732	.000373	Regulator of chromosome condensation
ERCC1	Hs00157145	3.686	.000431	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
RELB	Hs00232399	3.511	.000764	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
COL1A1	Hs00164004	3.492	.000817	Collagen type 1, $\alpha 1$
STAT3	Hs00374280	3.476	.000855	Signal transducer and activator of transcription 3
XIST	Hs00300535	3.299	.0015	X (inactive)—specific transcript (non-protein coding)
CCNB1IP1	Hs00603841	3.189	.002103	Cyclin B1 interacting protein 1
PIK3R1	Hs00236128	3.040	.003266	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)
TYMP	Hs00157317	2.745	.007583	Thymidine phosphorylase
HLA-C	Hs00740298	2.723	.00809	Major histocompatibility complex, class I, C
TFF3	Hs00173625	2.700	.008609	Trefoil factor 3 (intestinal)
EEF2	Hs00157330	2.687	.008919	Eukaryotic translation elongation factor 2

Abbreviation: CRT = chemoradiotherapy.

the patients, 32 (25%) did not respond to the CRT (TRG 0/1) whereas 13 (10%) had a complete response (TRG 4). After a median follow-up period of 41 months (range, 5-127 months), distant metastases had developed in 34 patients (26%) and local recurrence had developed in 11 patients (9%). At the date of the last follow-up, 25 patients had died (19%).

### Dynamic changes in tumor gene expression after CRT

Seventy-four tumor samples were available to compare gene expression before and after CRT. We performed qPCR to analyze the expression of 53 candidate genes (previously determined by our group through SAGE analysis). Of these candidate genes, 24 were significantly regulated ( $P < .01$ ), with 22 of them being upregulated and 2 being downregulated after CRT (Table 2 and Fig. E2, supplementary material). Of the 24 genes that changed significantly after CRT, the univariate Cox regression analysis showed that TFF3 upregulation was significantly associated with DFS (Table 3 and Fig. a). Classical factors, such as TNM pathologic stage and TRG, also showed prognostic value in terms of DFS (Table 4). The multivariate analysis confirmed that upregulation of TFF3 after CRT confers a hazard ratio of 2.64 (1.12-6.22 represents the 95% confidence interval) for relapse (Table 5, model 1).

### TFF3 immunostaining is a predictor of recurrence

To further characterize the impact of TFF3 upregulation, we analyzed TFF3 expression in the post-treatment samples by

immunohistochemistry. Eighty-two cases were successfully analyzed. In some tumors we observed a characteristic TFF3 secretion into the tumoral microgland lumen (Fig. E3, supplementary material). When this secretion was observed, the tumor was considered to be positive for TFF3 expression. By use of this dichotomous scoring system, 54 tumors (66%) were negative and 28 (34%) were positive for TFF3 immunostaining. TFF3 immunostaining was associated with worse OS (3-year OS, 85 months vs 65 months;  $P = .04$ ) and a higher risk of relapse in univariate (Table 4 and Fig. b) and multivariate analyses (Table 5, model 2) ( $P < .01$  for both).

### TFF3 transfectants acquired 5-FU resistance

To assess the biological importance of TFF3 in colorectal cancer, 10 colorectal cell lines (COLO201, HCT116, HT-29, LoVo, RKO, SW480, SW620, T84, WiDr, and DLD-1) were analyzed for expression of TFF3. None of these cell lines showed significant expression of TFF3 when analyzed by immunoblotting or by qPCR. Moreover, induction of TFF3 expression in DLD-1, HT-29, and SW620 after stimulation with 15- $\mu\text{mol/L}$  5-FU could not be observed at 24 h or 48 h after 5-FU induction (data not shown). To determine whether ectopically expressed TFF3 triggered resistance to 5-FU, we stably transfected DLD-1 cells with either empty vector or pCMV6-neo-TFF3 and evaluated 5-FU sensitivity. As shown in Fig. E4A (supplementary material), cells transfected with TFF3 showed a 10-fold increase in TFF3 messenger RNA (mRNA) compared with cells transfected with



**Table 3** Univariate analysis for DFS using genes with significantly changed expression after CRT

Gene symbol	Hazard ratio (95% CI)	P Value
ALDH1A1	1.79 (0.77-4.19)	.175
BCL2	1.48 (0.64-3.44)	.357
CCNB1IP1	2.19 (0.98-4.88)	.055
CDKN1	0.98 (0.37-2.62)	.976
CKB	1.91 (0.82-4.43)	.134
COL1A1	0.81 (0.34-1.95)	.644
DPYD	1.03 (0.41-2.59)	.941
EEF2	1.34 (0.60-2.98)	.478
ERCC1	1.57 (0.67-3.63)	.296
FOS	1.06 (0.32-3.56)	.917
GSTP1	1.37 (0.60-2.92)	.484
HIG2	1.44 (0.57-3.60)	.441
HLA-C	1.30 (0.58-2.89)	.524
ITGB4	1.96 (0.86-4.44)	.107
P4HTM	0.90 (0.38-2.18)	.825
PIK3R1	1.95 (0.89-4.29)	.096
PSMB6	1.42 (0.61-3.28)	.418
RCC1	1.48 (0.65-3.36)	.345
RELB	1.02 (0.44-2.37)	.960
SPARC	1.13 (0.42-3.02)	.805
STAT3	0.99 (0.43-2.31)	.991
TFF3*	2.56 (1.17-5.64)	.019
TYMP	0.99 (0.43-2.32)	.998
XIST	1.27 (0.55-2.94)	.578

Abbreviations: CI = confidence interval; CRT = chemotherapy; DFS = disease-free survival.

\* Statistically significant ( $P < .05$ ).

empty vector. Cells expressing TFF3 showed the same phenotype as the parental DLD-1 cell line. Cells transfected with TFF3 were significantly less sensitive to 5-FU, with an 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of  $105.64 \pm 77.98 \mu\text{mol/L}$  for TFF3-transfected cells and  $43.60 \pm 36.23 \mu\text{mol/L}$  for non-transfected cells ( $P < .05$ ) by Mann-Whitney  $U$  test (Fig. E4B, supplementary material).

### TFF3 induced changes in gene expression

To identify the pathways modulated by TFF3 upregulation, we conducted a global transcriptome analysis using whole-genome DNA microarrays. Using thresholds of a minimum fold change of 1.5 and a  $P$  value of  $< .05$ , we found 80 genes to be differentially expressed in the TFF3-transfected DLD-1 cells compared with the cells transfected with empty vector. Of the 80 altered genes, 30 were downregulated and 50 were upregulated. Gene ontology (GO) analysis showed that TFF3-transfected cells had a significant over-representation in GO categories involved in transcriptional activation, such as “transcription initiation GO: 0006352” with  $P < .001$ , “protein DNA complex assembly GO: 0065004” with  $P = .001$ , or “spliceosome assembly GO: 0000245” with  $P = .003$  (Table E2, supplementary material).

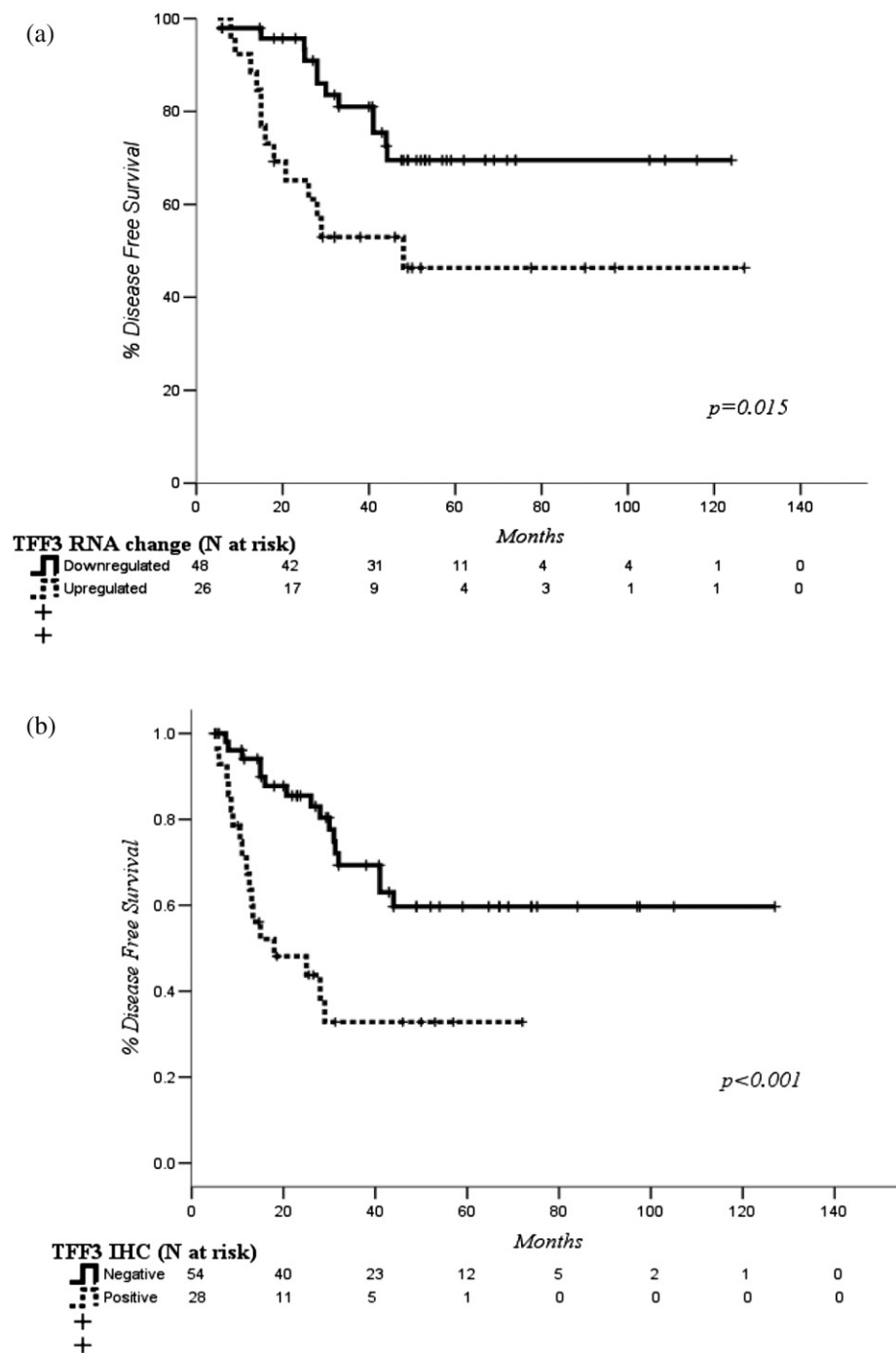
### Discussion

During the past few decades, the management of RC has evolved from postoperative to preoperative CRT. Although this

modality improves treatment efficacy and ameliorates toxicity, it still fails to cure a large number of patients. Despite major advances in the molecular understanding of RC, patient prognosis cannot be accurately predicted and relies on clinical and pathologic variables (5). At the same time, the preoperative strategy provides us with a great model to study the dynamic biological changes that occur when tumors are exposed to CRT by comparing the preoperative biopsy specimens with the postsurgical specimens. Almost a decade ago, Crane et al (12) wondered whether identifying RC markers that change in response to cytotoxic therapy could be of prognostic or therapeutic value. Our findings suggest that this might be the case for TFF3.

In this study we analyzed 53 candidate genes, almost half of which had previously been identified by evaluating the RC transcriptome of refractory patients (10), by comparing differential gene expression before and after treatment. Of these 53 genes, some were related to 5-FU metabolism and general multidrug resistance mechanisms and others had not previously been described to be involved in drug resistance. We found 24 genes whose expression significantly changed after CRT. These genes paint a complex picture of cell proliferation and apoptosis resistance as a result of the interaction between the tumor cells and tumoral microenvironment as a response to the treatment injury. These genes include transcription factors involved in cell proliferation, differentiation, and transformation (such as FOS, RCC1, and STAT3) and cell cycle regulators of G2/M (CCNB1IP1) and G1 (CDKN1). In addition, antiapoptotic genes, such as ALDH1A1 and BCL2, were upregulated. Of note, 1 of the upregulated genes, RELB, has also been shown to promote a more invasive phenotype in breast cancer cells through the induction of BCL2, as well as to confer resistance to radiation (13).

The only gene whose expression changes were associated with a patient prognosis was TFF3. Interestingly, TFF3 is a candidate target that was identified in our previous blind SAGE study and could provide an explanation for CRT resistance. It is a secreted protein that is expressed primarily by the goblet cells of the gastrointestinal epithelium (14). This protein promotes epithelial cell migration, protects mucosal epithelial cells from damage, and regulates the reconstitution of the intestinal mucosa after injury both *in vitro* and *in vivo* (15). Interestingly, the expression of TFF3 renders cancer cell lines resistant to the induction of apoptosis by a variety of agents (16). In line with this finding, we show that the increase in TFF3 mRNA after CRT in RC patients confers a higher risk of relapse (hazard ratio, 2.64;  $P = .027$ ). When we analyzed TFF3 immunostaining in the post-treated surgical specimens, we found an interesting pattern of TFF3 secretion into the lumen of the tumoral microglands in 34% of the analyzed tissues. Patients showing this pattern of TFF3 secretion also showed an increased risk of relapse similar to the mRNA results (hazard ratio, 2.51;  $P = .014$ ). This clear-cut dichotomic immunohistochemical test, if confirmed in an independent series of patients, could aid in the difficult treatment decision that follows preoperative CRT. Of note, the baseline expression of TFF3 in the diagnostic biopsy specimens, analyzed both by qPCR and by immunohistochemistry, did not correlate with prognosis (10). We have confirmed this finding in a series of 99 patients with stage II colon cancer; TFF3 expression analyzed by qPCR in the untreated tumor did not correlate with relapse-free survival (PC, June 2010).



**Fig.** Disease-free survival and TFF3 upregulation after CRT. a: TFF3 analysis by qPCR. b: TFF3 analysis by IHC. TFF3 = Trefoil factor 3; IHC = immunohistochemistry.

As a whole, these data support the hypothesis of a novel mechanism of secondary CRT resistance. Tumor cells that react to CRT by overexpressing TFF3 would be more aggressive and resistant to apoptosis. To test this hypothesis, we analyzed TFF3 expression in 10 colorectal cancer cell lines before and after 5-FU exposure. No basal TFF3 expression was observed. Moreover, no induction of TFF3 was observed in the 3 cell lines tested (DLD-1, HT-29, and SW620) after stimulation with 5-FU. This could be explained by the limitations of *in vitro* experiments, considering that prognostic TFF3 luminal

expression tends to lead to endocrine signaling. However, when TFF3 was stably transfected into DLD-1 cells, a cell line that better resembles the adenocarcinoma histology in a previous study using an orthotopic mouse model of colorectal cancer (17), a significant increase in 5-FU resistance was shown. In addition, TFF3-expressing DLD-1 cells induced the activation of the cellular transcription mechanism, as shown by the enrichment of genes included in GO categories related to transcription (Table E2, supplementary material). Our study has several drawbacks because it is retrospective, can be exposed

**Table 4** Univariate survival analysis

Factor	No. of patients	3-y DFS		3-y OS	
		% (95% CI)	P Value	% (95% CI)	P Value
All	129	65 (56-74)		85 (79-92)	
Sex			.85		.55
Male	71	68 (56-80)		85 (76-94)	
Female	58	62 (49-75)		85 (76-94)	
AJCC TNM pathologic stage			<.01		.06
0	13	83 (61-100)		92 (78-100)	
1	32	82 (67-96)		97 (86-100)	
2	48	66 (51-81)		86 (76-96)	
3	36	42 (24-60)		70 (53-86)	
Tumor regression grade			.07		.02
0/1	32	52 (33-71)		72 (56-89)	
2	70	63 (50-75)		86 (77-95)	
3	14	86 (67-100)		100 (-)	
4	13	83 (62-100)		92 (78-100)	
TFF3 PCR			.01		.15
≤0	48	81 (69-93)		94 (87-100)	
>0	26	53 (34-72)		83 (68-98)	
TFF3 IHC			<.01		.04
Negative	54	69 (55-83)		85 (75-95)	
Positive	28	33 (13-52)		65 (44-85)	

Abbreviations: AJCC = American Joint Committee on Cancer; CI = confidence interval; DFS = disease-free survival; IHC = immunohistochemistry; OS = overall survival; PCR = polymerase chain reaction; TFF3 = Trefoil factor 3.

to bias because of patient selection and exclusion of better responders from the analysis (because of lack of residual tumor), and needs further validation. However, considering the biological role of TFF3 and our functional findings, we can hypothesize that, in a subset of patients, inhibition of TFF3 could help to decrease CRT resistance. At the same time, and as with other treatments, overlapping mucosal toxicity can be anticipated. In support of this concern, the use of recombinant human intestinal trefoil factor has been shown to prevent oral mucositis in colorectal cancer patients receiving 5-FU; this treatment is currently in a phase II study (18). In any case, we believe that the potential utility of TFF3 as a therapeutic target merits closer examination.

In summary, we have conducted a dynamic evaluation of RC markers after preoperative CRT and have shown that a blindly screened candidate gene with prominent oncogenic functions in

the intestine can be upregulated in response to treatment; this upregulation leads to a higher risk of relapse. We provide insight into the mechanisms of resistance of RC to CRT and suggest further evaluation of TFF3 as a possible prognostic marker for RC.

## References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
2. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, *et al.* Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:1731-1740.
3. Bosset JF, Collette L, Calais G, *et al.* Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1114-1123.
4. Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, *et al.* Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol* 2009;27: 5124-5130.
5. Valentini V, van Stiphout RG, Lammering G, *et al.* Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials. *J Clin Oncol* 2011;29:3163-3172.
6. Raguz S, Yague E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. *Br J Cancer* 2008;99:387-391.
7. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, *et al.* Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23: 1826-1838.
8. Kim IJ, Lim SB, Kang HC, *et al.* Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007;50: 1342-1353.

**Table 5** Multivariate analysis for DFS with TFF3 RNA overexpression (model 1) and TFF3 IHC-positive staining (model 2)

Variable	Model 1		Model 2	
	Hazard ratio	P Value	Hazard ratio	P Value
Age (increase)	1	.89	1	.57
Pathologic stage (increase)	1.27	.41	1.61	.06
TRG (increase)	0.59	.13	.9	.69
TFF3 RNA overexpression	2.64	.027	-	-
TFF3 IHC (positive)	-	-	2.51	.014

Abbreviations: DFS = disease-free survival; IHC = immunohistochemistry; TFF3 = Trefoil factor 3; TRG = tumor regression grade.

9. Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, *et al.* Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:53-61.
10. Casado E, Garcia VM, Sanchez JJ, *et al.* A combined strategy of SAGE and quantitative PCR provides a 13-gene signature that predicts preoperative chemoradiotherapy response and outcome in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:4145-4154.
11. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997;12:19-23.
12. Crane CH, Thames HD, Hamilton SR. Will identifying or targeting altered marker expression in response to cytotoxic therapy be of prognostic or therapeutic value? *J Clin Oncol* 2003;21:3381-3382.
13. Mineva ND, Wang X, Yang S, *et al.* Inhibition of RelB by 1,25-dihydroxyvitamin D3 promotes sensitivity of breast cancer cells to radiation. *J Cell Physiol* 2009;220:593-599.
14. Hoffmann W. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2932-2938.
15. Durual S, Blanchard C, Estienne M, *et al.* Expression of human TFF3 in relation to growth of HT-29 cell subpopulations: involvement of PI3-K but not STAT6. *Differentiation* 2005;73:36-44.
16. Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:799-804.
17. Cespedes MV, Espina C, Garcia-Cabezas MA, *et al.* Orthotopic micro-injection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *Am J Pathol* 2007;170:1077-1085.
18. Peterson DE, Barker NP, Akhmadullina LI, *et al.* Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study of recombinant human intestinal trefoil factor oral spray for prevention of oral mucositis in patients with colorectal cancer who are receiving fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009;27:4333-4338.



# Clinical Cancer Research

## A Combined Strategy of SAGE and Quantitative PCR Provides a 13-Gene Signature that Predicts Preoperative Chemoradiotherapy Response and Outcome in Rectal Cancer

Enrique Casado, Victor Moreno García, Jose Javier Sánchez, et al.

*Clin Cancer Res* 2011;17:4145-4154. Published OnlineFirst April 5, 2011.

### Updated Version

Access the most recent version of this article at:  
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-10-2257](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2257)

### Supplementary Material

Access the most recent supplemental material at:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2011/04/08/1078-0432.CCR-10-2257.DC1.html>

### Cited Articles

This article cites 53 articles, 23 of which you can access for free at:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/12/4145.full.html#ref-list-1>

### E-mail alerts

[Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

### Reprints and Subscriptions

To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

### Permissions

To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at [permissions@aacr.org](mailto:permissions@aacr.org).

# A Combined Strategy of SAGE and Quantitative PCR Provides a 13-Genes Signature that Predicts Preoperative Chemoradiotherapy Response and Outcome in Rectal Cancer

Enrique Casado<sup>1</sup>, Victor Moreno García<sup>3,4</sup>, Jose Javier Sánchez<sup>7</sup>, Montserrat Blanco<sup>4</sup>, Joan Maurel<sup>8</sup>, Jaime Feliu<sup>3</sup>, Carlos Fernández-Martos<sup>10</sup>, Javier de Castro<sup>3,4</sup>, Beatriz Castelo<sup>3</sup>, Cristóbal Belda-Iniesta<sup>3,4</sup>, María Sereno<sup>1</sup>, Benito Sánchez-Llamas<sup>3</sup>, Emilio Burgos<sup>5</sup>, Miguel Ángel García-Cabezas<sup>5</sup>, Noemí Manceñido<sup>2</sup>, Rosa Miquel<sup>9</sup>, Damián García-Olmo<sup>6</sup>, Manuel González-Barón<sup>3</sup>, and Paloma Cejas<sup>4</sup>

## Abstract

**Purpose:** Preoperative chemoradiotherapy (CRT) is the treatment of choice for rectal cancer (RC), but half of the patients do not respond, suffer unnecessary toxicities, and surgery delays. We aimed to develop a model that could predict a clinically meaningful response to CRT by using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) biopsies.

**Experimental Design:** We first carried out an exploratory screening of candidate genes by using SAGE technology to evaluate dynamic changes in the RC transcriptome in selected refractory patients before and after CRT. Next, 53 genes (24 from SAGE and 29 from the literature) were analyzed by qPCR arrays in FFPE initial biopsies from 94 stage II/III RC patients who were preoperatively treated with CRT. Tumor response was defined by using Dworak's tumor regression grade (2–3–4 vs. 0–1). Multivariate Cox methods and stepwise algorithms were applied to generate an optimized predictor of response and outcome.

**Results:** In the training cohort (57 patients), a 13-gene signature predicted tumor response with 86% accuracy, 87% sensitivity, and 82% specificity. In a testing cohort (37 patients), the model correctly classified 6 of 7 nonresponders, with an overall accuracy of 76%. A signature-based score identified patients with a higher risk of relapse in univariate (3-year disease-free survival 64% vs. 90%,  $P = 0.001$ ) and multivariate analysis (HR = 4.35 95% CI: 1.2–15.75,  $P = 0.02$ ), in which it remained the only statistically significant prognostic factor.

**Conclusions:** A basal 13-gene signature efficiently predicted CRT response and outcome. Multicentric validation by the GEMCAD collaborative group is currently ongoing. If confirmed, the predictor could be used to improve patient selection in RC studies. *Clin Cancer Res*; 17(12): 4145–54. ©2011 AACR.

## Introduction

Preoperative chemoradiotherapy (CRT) is the standard treatment for stage II/III rectal cancer (RC). Compared with postoperative therapy, it improved local control and toler-

ability in the CAO/ARO/AIO 94 trial (1). More recently, the NSABP R-03 trial has reported a significant benefit in 5-year disease-free survival (DFS; ref. 2). Unfortunately, 5-fluorouracil (5FU)-based CRT produces a complete pathologic response in only 8% to 14% of the patients, and distant metastases develop in one-third of the cases after 5 years (1, 3, 4). Furthermore, patients who do not respond to preoperative CRT are exposed to unnecessary toxicities and resection of their primary tumor is delayed. Thus, the ability to predict treatment response and outcome before CRT is of the utmost importance to clinicians.

A number of postsurgical prognostic factors have been proposed (5–7), but CRT response cannot be clinically predicted. The identification of basal markers of resistance biomarkers could offer great help on this regard. Directed strategies that explore individual markers have not yielded clinically validated assays (7–9). Instead, gene expression arrays are appealing to predict the multifactorial event of treatment response (10–13). TaqMan Low Density Arrays (TLDA) can be done from routine formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) biopsies, making this platform of great interest for clinical application, as shown for the Oncotype

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Unidad de Oncología; <sup>2</sup>Unidad de Gastroenterología, Hospital Infanta Sofía; <sup>3</sup>Departamento de Oncología Médica; <sup>4</sup>Laboratorio de Oncología Trasnacional; <sup>5</sup>Departamento de Patología; <sup>6</sup>Unidad de Coloproctología, Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ); <sup>7</sup>Departamento de Bioestadística, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid; <sup>8</sup>Departamento de Oncología; <sup>9</sup>Departamento de Patología, Hospital Clinic, Barcelona; and <sup>10</sup>Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

**Note:** Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

E. Casado and V.M. Garcia equally contributed to this work.

**Corresponding Author:** Enrique Casado, Unidad de Oncología. Hospital Infanta Sofía. Avenida de Europa 34. San Sebastián de los Reyes, Madrid 28072, Spain. Phone: 34-618-398-170; Fax: 34-911-915-388; E-mail: [enrique.casado@salud.madrid.org](mailto:enrique.casado@salud.madrid.org)

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2257

©2011 American Association for Cancer Research.



## Translational Relevance

One of the most pressing questions in rectal cancer (RC) to date is to accurately identify those patients that benefit from preoperative chemoradiotherapy (CRT). Unfortunately, no basal prognostic factors predict response to preoperative CRT. To our knowledge, only 4 gene signatures have been published in RC aiming to predict pathologic response to CRT. None have been shown to predict patients with poor pathologic response and bad prognosis, who are likely to be the best candidates to explore alternative strategies to standard CRT. Herein, we present a basal 13-gene signature, the first one in RC obtained from clinical routinely prepared paraffin embedded tumors by using quantitative PCR that efficiently classifies CRT-induced tumor regression grade (accuracy 86%) and predicts poor responders in training and testing sets of patients. Importantly, a signature-based score remained the only prognostic factor in the multivariate analysis.

Dx Assay (Genomic Health Inc.) signature in breast cancer (14), endorsed by ASCO (15) and NCCN guidelines (16). Selecting appropriate genes for analysis seems critical.

In this study, we sought to define a clinically exploitable gene signature that could predict treatment response and outcome in preoperatively treated RC patients. First, we carried out an undirected screening of candidate genes by evaluating dynamic changes in the RC transcriptome, before and after CRT in selected treatment-refractory patients. Serial analysis of gene expression (SAGE) was ideal because it does not require a priori knowledge of the transcripts that are present in cells and it accurately quantitates mRNA levels of the transcriptome, allowing the discovery of new molecular targets (17). It provided a set of 24 genes whose expression was altered after CRT. In the second stage, we evaluated 29 genes selected from the literature and the SAGE-emerging candidates (for a total of 53 genes) by using TLDA cards in FFPE initial biopsies from 94 locally advanced preoperatively treated RC patients. Basal changes in gene expression were correlated with tumor regression grade (TRG) and patient outcome (defined as 3-year disease free survival). A set of 13 genes was identified that could predict both endpoints.

## Materials and Methods

The experimental design is depicted in Figure 1.

### Patients and treatment

**Undirected screening of candidate genes.** For the initial SAGE experiment, 25 patients from a RC neoadjuvant CRT trial were prospectively recruited (18). Chemotherapy consisted of a preoperative combination of oxaliplatin and raltitrexed (130 mg/m<sup>2</sup> and 3 mg/m<sup>2</sup>, days 1, 21, and 42)

on 3 cycles, together with preoperative radiotherapy (RT; 50.4 Gy in 28 fractions). We sought to evaluate dynamic changes in tumor transcriptome after CRT in refractory patients, as defined by lack of downstaging and minimal or null pathologic response according to Dworak's classification of TRG (TRG 0–1; ref. 19), with similar initial clinical stage (cT3N0, as diagnosed by using endorectal ultrasounds and MRI) and adequate fresh tissue samples. Successful libraries were obtained in 3 cases (patients A, B, and C) fulfilling the criteria. Patients A and C developed lung metastases 16 and 54 months after diagnosis, respectively, supporting the scenario of resistant disease.

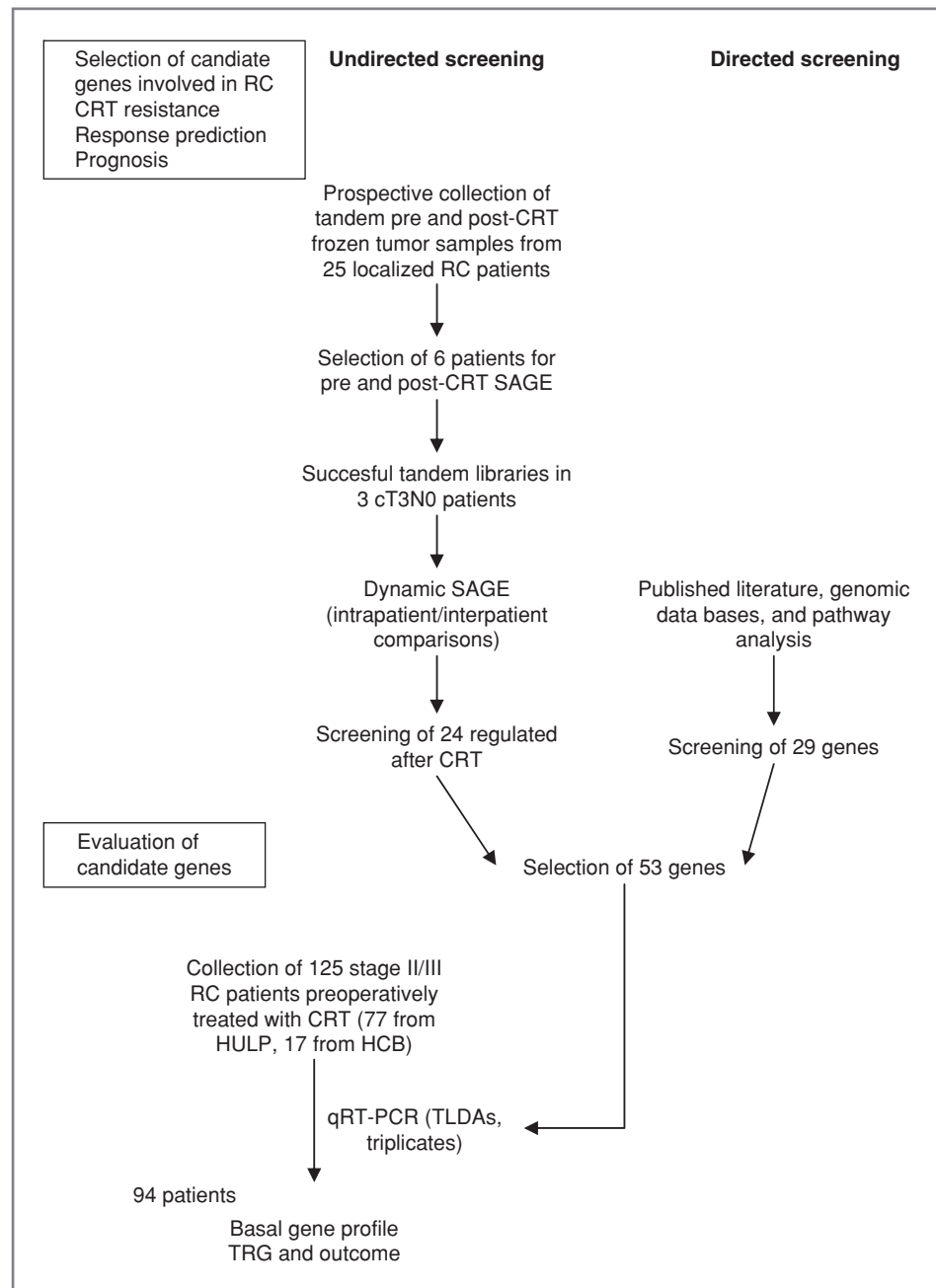
**Directed screening.** For the quantitative PCR (qPCR) study, 125 additional patients were retrospectively recruited. The patients had clinical stages II and III adenocarcinoma (defined by endoscopic ultrasound and/or MRI) of the rectum within 10 cms from the anal verge and were treated with 2 or more preoperative cycles of chemotherapy, concomitant with 50.4 Gy in 28 fractions. The specified clinical and pathologic variables were recorded (Table 1). Thirty-one patients were excluded because of unsuitable pathologic samples or incomplete gene expression or clinical data. Ninety-four patients were selected for the response prediction statistical analysis. Patients received 4 different chemotherapy regimens as follows: (a) 29 UFT (300 mg/m<sup>2</sup> on days 1–14 concurrent with radiotherapy) and leucovorin (250 mg/m<sup>2</sup> i.v. on day 1 and 7.5 mg/m<sup>2</sup>/12 h p.o. on days 2–14; ref. 20; b) 17 5FU 225 mg/m<sup>2</sup>/d in continuous infusion during RT; 48 patients were treated with concurrent oxaliplatin-based CRT, including 27 (c) receiving raltitrexed and oxaliplatin (3 mg/m<sup>2</sup> and 130 mg/m<sup>2</sup>, respectively, on days 1, 21, and 42), and 21 (d) 2 cycles of standard XELOX followed capecitabine (825 mg/m<sup>2</sup>/12 h) on radiotherapy days. Follow-up occurred at 3-month intervals for 2 years, 6-month intervals the third year, and yearly thereafter. Evaluations consisted of anamnesis, physical examination, and blood tests. Complete colonoscopy, chest radiography, abdominal ultrasound, and abdominopelvic CT were also scheduled according to local guidelines. Local and distance recurrence was histologically confirmed whenever possible. Alternate criteria included sequential enlargement of a mass or distant nodules in radiologic studies.

Institutional approval from our ethical committee was obtained for the conduct of the study. Patients provided written consent so that their samples and clinical data could be used for investigational purposes.

### Response and TRG

Two independent expert surgical pathologists who were blinded to patient outcome evaluated TRG according to the classification of Dworak, as described by Rodell and colleagues (19, 21). Response to CRT was considered as TRG greater than 0–1. The kappa index was used to evaluate concordance between the 2 observers and the pathologists discussed discordant results.

**Figure 1.** Flow chart of patients.  
Abbreviations: HCB, Hospital  
Clinic Barcelona; HULP, Hospital  
Universitario La Paz.



### Construction of SAGE libraries and analysis

To identify genes involved in RC treatment response, a previous exploratory SAGE study was done. SAGE libraries were generated from initial tumor biopsies before CRT and postoperative specimens from patients A, B, and C. Tumor specimens were snap frozen in liquid nitrogen at  $-70^{\circ}\text{C}$  and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Eligible samples were composed of at least 90% of tumor cells. SAGE was done as described in the Supplementary Material. The pairwise comparisons (before and after treatment for each patient) were determined by using Monte Carlo simulation to identify transcripts in which difference was

statistically different at  $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.05$  (Supplementary Tables S1 and S2). Gene matches for significant tags were manually verified by using SAGE Genie (22). Eligibility of SAGE genes for qPCR analysis was based on statistically significant altered expression, similar regulation trend (up/downregulation) across the 3 patients, and biological plausibility according to the published literature.

### RNA extraction and qPCR

FFPE tumor sections from the initial biopsies of the 125 patients were reviewed by an expert pathologist. Ninety-four patients were selected after excluding cases with



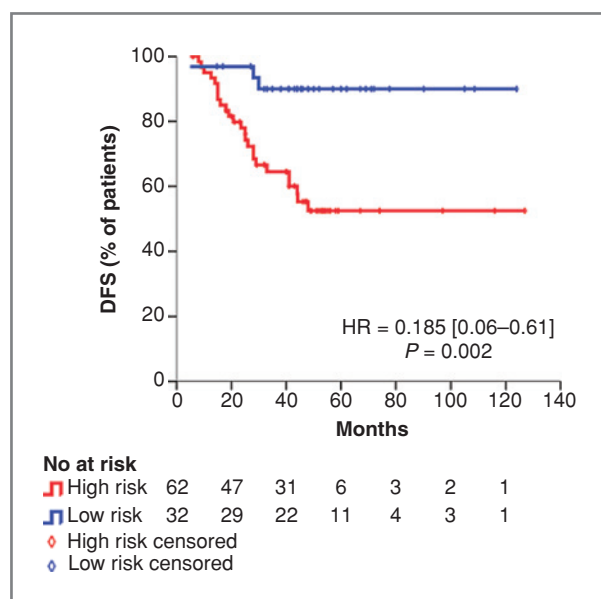


Figure 2. DFS according to the score determined by the 13-gene signature ( $\leq 2$  high risk, versus  $> 2$  low risk).

insufficient tumor cells, incomplete clinical data, or unsuccessful amplification results. More than 75% tumor cells enrichment was ensured, when necessary, by subsequent macrodissection with the use of a safety blade and new confirmatory H&E staining in postoperative biopsies. RNA was extracted from 10 to 15 five-micrometer sections by using the Masterpure RNA Purification Kit (Episentre Biotechnologies) according to the manufacturer's instructions, detailed in Supplementary Material.

qPCR was done by using the ABI Primis 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems), according to manufacturer's instructions. TLDA design was done as described in the Supplementary Material.

### Statistical analysis

Testing for associations between response and clinical variables was done with  $\chi^2$  test (Yates corrected) or Fisher's exact tests for categorical variables.

The expression of each gene was measured in triplicate, and the average intensity in the microarray was assessed. To reduce variation between microarrays, the intensity values for each sample in each microarray were rescaled by means of a quantile normalization method. Each intensity value was then log-transformed to a base-2 scale. qPCR data results were normalized against the 3 most stable genes (*GAPDH*, *B2M*, and *PMSB4*) before analysis. The stability of the expression of the candidate control genes was determined with *genNorm* (23).

The total sample size was randomly assigned to either a training cohort (60%) or a testing cohort (40%; Supplementary Fig. S1). Patients were classified into 3 groups (TRG 0–1, TRG2–3, and TRG4). We used a supervised class prediction by stepwise forwards and backwards discriminant analysis method to define a subset of genes predictive

of response. This model was applied to the testing cohort to validate its usefulness. Accuracy, sensitivity, specificity, positive predictive values (PPV), and negative predictive values (NPV) were calculated (more detailed in Supplementary Materials).

Two-factor analyses were calculated ( $F_1$  and  $F_2$ , the discriminant functions) for the genes that were selected by discriminant analysis. A score was obtained for every patient with the formula:

$$\text{Score} = \sqrt{F_1^2 + F_2^2}$$

To determine differences in DFS and overall survival (OS; measured from the time of diagnosis), univariate analyses were done according to the Kaplan–Meier method. Comparisons between curves were evaluated with the log-rank test. Cox regression was used for the multivariate analysis. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant, and all tests were 2-tailed. The proportional hazards assumption for covariates was investigated by examining the scaled Schoenfeld residuals. SPSS 17.0 and SLPUS v. 6. were used for statistical analysis.

## Results

### SAGE screening of transcriptome changes after CRT

Six SAGE-libraries were generated from patients A, B, and C. Every patient was studied before and after treatment. Pairwise comparisons revealed statistically significant dynamic changes in gene expression when libraries were compared before and after treatment for each patient ( $P < 0.01$ ). The numbers of tags, unique tags for each library, and dynamic changes are shown in Supplementary Tables S1 and S2. Certain tag-corresponding genes significantly altered after treatment included tissue specific genes such as the trefoil-family factor 3 (*TFF3*) and the gastrointestinal glutathione peroxidase 2 (*GPX2*) or transcripts associated with treatment response as glutathione S-transferase pi or with fibrotic response after injury, such as collagen type I alpha 1 (*COL1A1*) and secreted protein acidic cysteine-rich (*SPARC*). For qPCR analysis, we focused on 24 genes that were significantly regulated in pairwise comparisons (Supplementary Table S2) in addition to 29 genes previously reported to be involved in colorectal carcinogenesis or treatment response (Supplementary Table S3).

### Clinicopathologic data for qPCR study

A total of 94 patients were analyzed (77 patients from Hospital La Paz, Madrid and 17 from Hospital Clinic of Barcelona). A flow diagram of the patients is depicted in Figure 1. Clinicopathologic data are shown in Table 1. After a median follow-up of 46 months (range 6–127 months), local relapse occurred in 6 patients (7%) and distant metastases occurred in 22 (23%). The 3-year DFS was 73% (95% CI: 64–82) and 3-year OS was 90% (95% CI: 84–96). TRG 0–1, 2, 3, and 4 were seen in 18, 53, 11, and 12 patients, respectively, with good concordance between pathologists (Kappa = 0.7).

**Table 1.** Clinicopathologic characteristics

Characteristic	All, n (%)	TRG 0–1, n (%)	TRG 2/3, n (%)	TRG 4, n (%)	P
Total	94 (100)	18 (19.1)	64 (68.1)	12 (12.8)	
Gender					
Male	54 (57)	11 (61)	37 (57)	6 (50)	0.83
Female	40 (43)	7 (39)	27 (42)	6 (50)	
Age, y					
≤65	51 (54)	9 (50)	33 (52)	9 (75)	0.30
>65	43 (46)	9 (50)	31 (48)	3 (25)	
ECOG					
0	51 (54)	8 (44)	36 (56)	7 (58)	0.84
1	40 (43)	9 (50)	26 (41)	5 (42)	
2	3 (3)	1 (6)	2 (3)	0	
Concurrent chemotherapy					
Fluoropyrimidines	46 (49)	14 (78)	27 (42)	5 (42)	0.02
Oxaliplatin based	48 (51)	4 (22)	37 (58)	7 (58)	
CEA					
≤2.5 ng/mL	34 (36)	8 (44)	18 (28)	8 (67)	0.06
>2.5 ng/mL	53 (56)	10 (56)	39 (61)	4 (33)	
Unknown	7 (7)	0 (0)	7 (11)	(0)	
Clinical stage (AJCC TNM)					
I	4 (4)	0 (0)	3 (5)	1 (8)	0.73
II	49 (52)	11 (61)	33 (52)	5 (42)	
III	41 (43)	7 (39)	28 (44)	6 (50)	
Pathologic stage (AJCC TNM)					
0	12 (13)	0 (0)	0 (0)	12 (100)	<.01
I	24 (26)	4 (22)	20 (31)	0 (0)	
II	40 (43)	7 (39)	33 (52)	0 (0)	
III	18 (19)	7 (39)	11 (17)	0 (0)	
Score					
>2	32 (34)	9 (50)	17 (27)	6 (50)	0.08
≤2	62 (66)	9 (50)	47 (73)	6 (50)	
Relapse					
No	66 (70)	11 (61)	44 (69)	11 (92)	0.43
Local	6 (6)	2 (11)	4 (6)	0 (0)	
Distant	22 (23)	5 (28)	16 (25)	1 (8)	
Death					
No	80 (85)	14 (78)	54 (84)	12 (100)	0.24
Yes	14 (15)	4 (22)	10 (16)	0 (0)	

Abbreviations: AJCC, American Joint Committee on Cancer; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; UFT-LV, UFT and leucovorin.

### Development of a response predictor

From the 53 genes, 13 were selected by discriminant analysis to build a predictor of response (Table 2). In the training cohort, the model correctly classified 86% of the cases (49 of 57). Two nonresponsive patients (TRG 0/1) and 6 responsive cases (TRG 2, 3, and 4) were misclassified. The test correctly classified 87% of responders (sensitivity) and 82% of nonresponders (specificity). The PPV was 95% and the NPV was 60%. In the testing cohort, the model correctly classified 6 of 7 nonresponders (specificity = 86%) and 22 of 30 responders (sensitivity = 73%), with

an overall accuracy of 76% (Supplementary Fig. S1) and a PPV of 95%.

### Score for DFS

The 13-gene score was applied to the entire cohort of patients and was inversely correlated with DFS. Prognostic groups were defined as low (>2) and high risk (≤2) (Figure 2). Clinical variables, except for basal carcinoembryonic antigen level (CEA), did not differ between risks groups. On univariate analysis, the risk score was significantly correlated with DFS along with pathologic variables [AJCC

**Table 2.** 13-Gene signature

Gene	Gene origin	Unigene number	Expression in responders compared with nonresponders	Description
<i>ALDH1A1</i>	1	Hs.76392	Overexpressed	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
<i>BAK1</i>	1	Hs.485139	Downregulated	BCL2-antagonist/killer 1
<i>CDKN1</i>	1	Hs.370771	Overexpressed	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
<i>FOS</i>	1	Hs.25647	Overexpressed	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
<i>MLH1</i>	1	Hs.195364	Downregulated	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 ( <i>E. coli</i> )
<i>RELB</i>	1	Hs.654402	Overexpressed	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
<i>STAT3</i>	1	Hs.463059	Overexpressed	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
<i>TYMS</i>	1	Hs.592338	Downregulated	Thymidylate synthetase
<i>CKB</i>	2	Hs.173724	Downregulated	Creatine kinase, brain
<i>GPX2</i>	2	Hs.2704	Downregulated	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
<i>HIG2</i>	2	Hs.710088	Downregulated	Hypoxia-inducible protein 2
<i>PH-4</i>	2	Hs.654944	Downregulated	Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase
<i>TFF3</i>	2	Hs.82961	Overexpressed	Trefoil factor 3 (intestinal)

1: Bibliography; 2: SAGE analysis.

Stage, ypT (post-CRT-yatrogenic pathologic T) and ypN (post-CRT-yatrogenic pathologic N; Table 3)]. Given the heterogeneity of the sample, we investigated whether the type of chemotherapy received impacted the scoring results. When stratifying by treatment, the score remained statistically significant ( $P = 0.03$  and  $P = 0.01$  for fluoropyrimidines alone and oxaliplatin-based CRT, respectively; Supplementary Fig. S2). Univariate stratified analysis for other factors, such as ypT and ypN, confirmed the independent prognostic value of the score for DFS (Supplementary Figs. S3 and S4). Interestingly, the score was such a strong predictor of DFS that it remained the only statistically significant factor when Cox multivariate analysis was used, adjusted for age, ypT, ypN, CEA, and tumor response (HR = 4.35 95% CI: 1.20–15.75; Table 4).

## Discussion

Treatment and tumor-related factors determined after surgery, primarily CRM and nodal status, have been associated with RC recurrence (5). However, individualized treatment selection for patients with RC relies on pretreatment clinical variables that do not predict the efficacy of neoadjuvant therapy. This study used a sequential genomic strategy to identify a basal 13-gene signature that correctly predicted RC preoperative CRT response in 86% of patients in a training set and 6 of 7 nonresponders in a confirmatory testing cohort. Also, it predicted 2 groups of patients with clear differences in DFS.

This predictor model offers some advantages over other published tumor gene signatures that evaluate response to preoperative RT (24) or combined CRT (10, 12, 13, 25) in terms of clinical feasibility, relevance of the surrogate

marker, and prognostic ability. This is the only signature obtained from small amounts of routinely prepared FFPE endoscopic samples by using a qPCR platform. In addition, the endpoint of tumor downstaging used by Ghadimi and colleagues (10) is subjected to numerous evaluation pitfalls. In contrast, TRG provides direct biological information about cytotoxicity, clearly beyond downstaging (26), and it seems to correlate with prognosis in both RC (21, 27–30) and other tumors (31–35). Furthermore, the 13-gene signature is the only one that predicts Dworak's TRG 0–1, which is the group containing the poorest responders. These patients likely have a bad prognosis and would be good candidates for alternative strategies to standard CRT, such as new drugs, doses, and time strategies. TRG 0–1 accounted for 25% of the patients in the largest data set from a randomized trial (21) and 19.1% of the patients in our series. Conversely, identifying patients with some grade of response (95% PPV in the training and testing cohorts) would be very important to further explore the promising strategy of induction chemotherapy that has been recently supported by the GEMCAD GCR3 randomized phase II trial (36). It would exclude those patients who do not benefit from CRT and prevent them from delaying surgical definitive treatment. Because CRT is standard treatment for stage II/III RC, the clinical interest of predicting Dworak's TRG 1–2–3 versus TRG 4 or patients with less than 10% tumor viable cells, as reported by Kim (12) and Rimkus (13), respectively, is less evident. In contrast, a new kinase profile has shown correlation between basal kinase activity and response to CRT in good, intermediate, and poor responders, although it was only validated among good and intermediate responders (25). Besides, these

**Table 3.** Univariate analysis for DFS

Factor	No. of patients	3-year DFS, % (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
All	94	73 (64–82)			
Age, y					
≤65	51	70 (57–83)	0.52	1.28 (0.6–2.7)	0.52
>65	43	77 (64–90)			
ypT					
T0	14	92 (76–100)	0.15	2.03 (1.1–3.5) <sup>a</sup>	0.01
T1	4	100 (–)			
T2	21	74 (55–94)			
T3	53	65 (51–78)			
T4	2	100 (–)			
ypN					
N0	76	79 (69–88)	.01	0.39 (0.18–0.85)	0.02
N+	18	53 (29–77)			
AJCC TNM pathologic stage					
0	12	90 (71–100)	0.06	1.75 (1.1–2.7) <sup>b</sup>	0.01
I	24	78 (61–95)			
II	40	75 (61–90)			
III	18	53 (29–77)			
Response to treatment					
No (TRG 0/1)	18	63 (39–86)	0.41	1	0.41
Yes (TRG 2,3,4)	76	75 (65–85)		0.7 (0.3–1.6)	
CEA level					
0–2.5 ng/mL	34	84 (71–97)	0.15	0.54 (0.22–1.28)	0.16
>2.5 ng/mL	53	69 (56–82)			
Risk score					
≤2	62	64 (52–77)	<0.01		
>2	32	90 (79–100)		0.185 (0.06–0.61)	<0.01

<sup>a</sup>Reference value for HR: ypT increment.<sup>b</sup>Reference value for HR: AJCC TNM pathologic stage increment.

signatures have not been associated with prognosis. Our signature prognostic score remained the only statistically significant factor, even above postsurgical ypT and ypN, following multivariate analysis (HR = 4.35 95% CI: 1.2–15.75,  $P = 0.02$ ). In our series, the TRG predictive signature-derived score, but not the TRG classification, correlated with outcome. A conceivable explanation for this phenomenon could be that the molecular portrait retrieves deeper informative biological aspects beyond TRG. In fact, a prognostic versus merely predictive capability cannot be excluded.

Limitations of our study include the small number of patients comprising the training and testing sets (57 and 37, respectively) and the heterogeneous treatment schedules. However, this study was larger than other RT/CRT predictive signatures published in RC. All patients received combined CRT with at least 2 cycles of chemotherapy. Therefore, it is not possible to determine whether their response was the result of either treatment component or the combined therapy. Nonetheless, combined CRT is the

usual strategy, and the score identified significant DFS differences in both 5FU and oxaliplatin-based CRT groups ( $P = 0.03$  and  $P = 0.015$ , respectively). Of note, recent data from randomized trials do not support the use of oxaliplatin during concurrent preoperative CRT in RC (37, 38).

**Table 4.** Multivariate analysis for DFS

	HR (95% CI)	P
Age (≤65 vs. >65)	1.25 (0.55–2.82)	0.59
CEA (0–2.5 vs. >2.5 ng/mL)	0.88 (0.35–2.24)	0.80
ypT (T increment)	1.60 (0.96–2.69)	0.07
ypN (negative vs. positive)	0.65 (0.27–1.58)	0.58
Response to treatment (yes vs. no) <sup>a</sup>	0.76 (0.29–1.98)	0.59
Risk score (≤2 vs. >2)	4.35 (1.20–15.75)	0.02

<sup>a</sup>Response to treatment assessed as TRG 2, 3, 4.

In 2003, Crane and colleagues underlined an interest in identifying altered marker expression in response to preoperative treatment (39). We present the first global "dynamic" transcriptome study. Importantly, this study was done in CRT refractory patients by using SAGE, a powerful genomic tool. This labor-intensive method is very quantitative and is not restricted to a finite number of gene sequences localized to a chip. Although the exploratory study was restricted to 3 selected patients (cT3N0, TRG 0–1), the "inpatient" changes in the Monte Carlo analysis provided plausible biological data. The majority of regulated genes were involved in oncogenic functions, and one-fourth of the observed changes (regulation of 24 genes) were shared among the 3 cases. These data highlighted interesting candidates for prognostic and functional evaluations. Moreover, regulated tags included an interesting 10% of expressed sequence tags.

The CRT-induced fibrosis in the surgical specimens was mirrored at the molecular level by upregulation of genes involved in the healing process. These genes included *COL1A1*, the key enzyme in the synthesis of collagens, *PH-4* (40), and the *TFE3* protein, which is involved in mucous restitution (41). The production of free radicals and hypoxia resulted in the regulation of *GPX2* (42), *HIG-2* (43), and angiopoietin-like 4 (44). Other genes that were consistently regulated have roles in cell-cycle proliferation and apoptosis and include *CCNB1IP1* (45) and *RCC1* (46). *EEF2*, an essential factor for protein synthesis that plays a role in gastrointestinal carcinogenesis (47), and *WARS*, a gene associated with poor prognosis in colorectal cancer (48), were also identified. Genes participating in the metastatic process were identified, including *MMP14* (49), *integrin B4* (50), and *SPARC*, a key controller of cell–matrix interactions that is also associated with tumor angiogenesis and metastasis (51, 52).

The SAGE screen of candidate genes added important value to the development of the gene predictor set. SAGE

provided 5 of the 13 predictive genes (*CKB*, *GPX2*, *HIG-2*, *PH-4*, and *TFE3*) and a relatively small number of genes was required as compared with the other RC gene signatures [13 vs. 33 (ref. 11), 42 (ref. 13), 54 (ref. 10), 86 (ref. 25), and 95 (12)]. In general, genes in the signature suggest cell defense against CRT injury. This is exemplified by the downregulation of cell proliferation and apoptosis moderators, including the antiapoptotic *BAK1* (53) gene and the antioxidant *GPX2* (42), and the overexpression of the growth inhibitor *CDKN1* (54) in responders. Consistent with most reports, thymidylate synthetase was overexpressed in nonresponders (55). Notably, only *GPX2* has been previously reported as a component of other RC signatures (24). The lack of consistency among RC signatures is indicative of the complexity of resistance pathways in response to treatment injury.

In summary, by using a sequential genomic approach, we have developed a clinically exploitable gene signature that eventually may help select RC patients for customized treatment. Our results need to be confirmed and retrospective validation in well-controlled prospective clinical trials is currently ongoing by GEMCAD.

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Grant Support

This work has been funded by a FIS PI021094 grant. P. Cejas was supported by Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) programa PAO 2010. V.M. García was supported by Fundación Para la Investigación Biomédica del Hospital La Paz (FIBHULP) grant: REX 09.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received August 26, 2010; revised January 28, 2011; accepted February 18, 2011; published OnlineFirst April 5, 2011.

## References

1. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1731–40.
2. Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, Yothers G, Deutsch M, Allegra CJ, et al. Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol* 2009;27:5124–30.
3. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1114–23.
4. Gérard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouché O, Chapet O, Clouston-Dejardin MT, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3–4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol* 2006;24:4620–5.
5. Nagtegaal ID, Gossens MJ, Marijnen CA, Rutten HJ, van d V, van Krieken JH. Combinations of tumor and treatment parameters are more discriminative for prognosis than the present TNM system in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:1647–50.
6. Quirke P, Steele R, Monson J, Grieve R, Khanna S, Couture J, et al. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. *Lancet* 2009;373:821–8.
7. Smith FM, Reynolds JV, Miller N, Stephens RB, Kennedy MJ. Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:55–64.
8. Johnston PG. Prognostic markers of local relapse in rectal cancer: are we any further forward? *J Clin Oncol* 2006;24:4049–50.
9. Bertolini F, Bengala C, Losi L, Pagano M, Iachetta F, Dealis C, et al. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:1455–61.
10. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23:1826–38.
11. Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res* 2006;66:3370–4.



12. Kim IJ, Lim SB, Kang HC, Chang HJ, Ahn SA, Park HW, et al. Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007;50:1342–53.
13. Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, Theisen J, Mages J, Becker K, et al. Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:53–61.
14. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817–26.
15. Harris L, Fritzsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5287–312.
16. NCCN Clinical practice guidelines in oncology breast cancer (V.2.2010). 2010.
17. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995;270:484–7.
18. Casado E, De Castro J, Castelo B, Sanchez B, Feliu J, Escribano A, et al. Phase II study of neoadjuvant treatment of rectal cancer with oxaliplatin, raltitrexed and radiotherapy. *J Clin Oncol* 22:14s, 2004 (suppl: abstr 3746).
19. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997;12:19–23.
20. Feliu J, Calvillo J, Escribano A, de Castro J, Sánchez ME, Mata A, et al. Neoadjuvant therapy of rectal carcinoma with UFT-leucovorin plus radiotherapy. *Ann Oncol* 2002;13:730–6.
21. Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Füzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8688–96.
22. Lal A, Lash AE, Altschul SF, Velculescu V, Zhang L, McLendon RE, et al. A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res* 1999;59:5403–7.
23. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:34.1–34.11.
24. Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res* 2006;66:3370–4.
25. Folkvord S, Flatmark K, Dueland S, de Wijn R, Grøholt KK, Hole KH, et al. Prediction of response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer by multiplex kinase activity profiling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;78:555–62.
26. Vironen J, Juhola M, Kairaluoma M, Jantunen I, Kellokumpu I. Tumour regression grading in the evaluation of tumour response after different preoperative radiotherapy treatments for rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2005;20:440–5.
27. Bouzourene H, Bosman FT, Seelentag W, Matter M, Coucke P. Importance of tumor regression assessment in predicting the outcome in patients with locally advanced rectal carcinoma who are treated with preoperative radiotherapy. *Cancer* 2002;94:1121–30.
28. Losi L, Luppi G, Gavioli M, Iachetta F, Bertolini F, D'Amico R, et al. Prognostic value of Dworak grade of regression (GR) in patients with rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 2006;21:645–51.
29. Lindebjerg J, Spindler KL, Ploen J, Jakobsen A. The prognostic value of lymph node metastases and tumour regression grade in rectal cancer patients treated with long-course preoperative chemoradiotherapy. *Colorectal Dis* 2009;11:264–9.
30. Guillem JG, Chessin DB, Cohen AM, Shia J, Mazumdar M, Enker W, et al. Long-term oncologic outcome following preoperative combined modality therapy and total mesorectal excision of locally advanced rectal cancer. *Ann Surg* 2005;241:829–36.
31. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Mamay J, Henry-Amar M, Petiot JF, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994;73:2680–6.
32. Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, Ott K, Fink U, Busch R, et al. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2003;98:1521–30.
33. Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, Pazdur R, Dumas P, Ajani JA. Response to neoadjuvant chemotherapy best predicts survival after curative resection of gastric cancer. *Ann Surg* 1999;229:303–8.
34. Rödel C, Grabenbauer GG, Kühn R, Papadopoulos T, Dunst J, Meyer M, et al. Combined-modality treatment and selective organ preservation in invasive bladder cancer: long-term results. *J Clin Oncol* 2002;20:3061–71.
35. Braun OM, Neumeister B, Popp W, Scherrer R, Dobrowsky E, Dobrowsky W, et al. Histologic tumor regression grades in squamous cell carcinoma of the head and neck after preoperative radiochemotherapy. *Cancer* 1989;63:1097–100.
36. Fernández-Martos C, Pericay C, Aparicio J, Salud A, Safont M, Massuti B, et al. Phase II, randomized study of concomitant chemoradiotherapy followed by surgery and adjuvant capecitabine plus oxaliplatin (CAPOX) compared with induction CAPOX followed by concomitant chemoradiotherapy and surgery in magnetic resonance imaging-defined, locally advanced rectal cancer: Grupo cancer de recto 3 study. *J Clin Oncol* 2010;28:859–65.
37. Gérard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, Martel-Laffay I, Hennequin C, Etienne PL, et al. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodiges 2. *J Clin Oncol* 2010;28:1638–44.
38. Aschele C, Pinto C, Cordio G, Rosati G, Tagliagambe A, Artale S, et al. Preoperative fluorouracil (FU)-based chemoradiation with and without weekly oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic response analysis of the Studio Terapia Adiuvante Retto (STAR)-01 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2009;27.
39. Crane CH, Thames HD, Hamilton SR. Will identifying or targeting altered marker expression in response to cytotoxic therapy be of prognostic or therapeutic value? *J Clin Oncol* 2003;21:3381–2.
40. Mlylyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets. *Ann Med* 2008;40:402–17.
41. Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL, Oates P, Murgue B, DeBeaumont M, et al. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem* 1993;268:6694–702.
42. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999;27:951–65.
43. Denko N, Schindler C, Koong A, Laderoute K, Green C, Giaccia A. Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2000;6:480–7.
44. Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamandé N, Favier J, et al. Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2003;162:1521–8.
45. Grönholm M, Muranen T, Toby GG, Utermark T, Hanemann CO, Golemis EA, et al. A functional association between merlin and HEI10, a cell cycle regulator. *Oncogene* 2006;25:4389–98.
46. Ohtsubo M, Okazaki H, Nishimoto T. The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation localizes in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol* 1989;109:1389–97.
47. Nakamura J, Aoyagi S, Nanchi I, Nakatsuka S, Hirata E, Shibata S, et al. Overexpression of eukaryotic elongation factor eEF2 in gastrointestinal cancers and its involvement in G2/M progression in the cell cycle. *Int J Oncol* 2009;34:1181–9.
48. Ghanipour A, Jirstrom K, Ponten F, Glimelius B, Pahlman L, Birgisson H. The prognostic significance of tryptophanyl-tRNA synthetase in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:2949–56.
49. Fisher KE, Sacharidou A, Stratman AN, Mayo AM, Fisher SB, Mahan RD, et al. MT1-MMP- and Cdc42-dependent signaling co-regulate

- cell invasion and tunnel formation in 3D collagen matrices. *J Cell Sci* 2009;122:4558–69.
50. Robertson JH, Yang SY, Winslet MC, Seifalian AM. Functional blocking of specific integrins inhibit colonic cancer migration. *Clin Exp Metastasis* 2009;26:769–80.
  51. Le BB, Faouzi S, Boussarie L, Guirouilh J, Blanc JF, Carles J, et al. Osteonectin/SPARC is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 1999;189:46–52.
  52. Porte H, Chastre E, Prevot S, Nordlinger B, Empereur S, Basset P, et al. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J Cancer* 1995;64:70–5.
  53. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14681–6.
  54. Schreiber M, Muller WJ, Singh G, Graham FL. Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21(WAF1/CIP1) and p27KIP1 in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene* 1999;18:1663–76.
  55. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004;22:529–36.





# Immunohistochemical analysis of tumour regression grade for rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy

V. Moreno García\*, J. F. Batlle\*, E. Casado†, E. Burgos‡, J. de Castro\*, C. Belda\*, J. Barriuso\*, J. J. Sánchez§, M. Á. García-Cabezas‡, M. González-Barón\* and P. Cejas\*

\*Service of Medical Oncology, La Paz University Hospital, †Department of Medical Oncology, Hospital Infanta Sofía, ‡Service of Pathology, La Paz University Hospital and §Department of Preventive Medicine, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

Received 12 March 2010; accepted 13 May 2010; Accepted Article online 16 August 2010

## Abstract

**Aim** Tumour regression grade (TRG) as defined by Rödel *et al.* has been used as an independent prognostic factor for rectal carcinoma after preoperative treatment by chemoradiotherapy (CRT). Determination of TRG 2 and 3, semiquantitatively defined as more or less than 50% tumour regression, respectively, does not appear to correlate with prognosis. The purpose of this study was to find an immunohistochemical pattern to permit improved stratification of intermediate responders defined by disease free (DFS) and overall survival (OS).

**Method** Immunohistochemistry of EGFR (epidermal growth factor receptor), VEGF (vascular endothelial growth factor), CD133 antibody, p53 antibody and Ki67 antibody was evaluated using tissue microarrays (TMA) on post-treatment surgical specimens from 88 patients. CD133 expression was confirmed in the whole section when available.

**Results** At a median follow-up of 40 months, TRG was found to be an independent predictor of DFS ( $P = 0.05$ ) and OS ( $P = 0.001$ ) but no differences were found between TRG 2 and 3 in terms of DFS ( $P = 0.74$ ) or OS ( $P = 0.41$ ). The results of TMA showed an immunohis-

tochemically poor prognostic profile for intermediate responders configured by negativity of CD133 expression. However, when examining CD133 expression in the whole section, there was an intermediate correlation with TMA and the prognostic significance was lost.

**Conclusion** The results did not confirm the value of immunohistochemistry in predicting the prognosis of patients with rectal cancer following neoadjuvant chemoradiotherapy. This questions the accuracy of TMA in detecting CD133 expression in this setting.

**Keywords** CD133, immunohistochemistry, neoadjuvant chemoradiotherapy rectal cancer, tissue microarrays

## What is new in this paper?

There is increasing interest in finding molecular predictors of outcome in rectal cancer. In this study VEGF, EGFR, Ki67, p53 and CD133 failed to predict relapse or survival of rectal cancer patients after neoadjuvant chemoradiotherapy. The expression of CD133 in tissue microarrays did not reflect the real expression assessed in the whole section due to heterogeneous staining.

## Introduction

Colorectal carcinoma is one of the leading causes of cancer mortality worldwide, and rectal cancer accounts for 30–35% of these cases [1]. Preoperative chemoradiotherapy (CRT) followed by total mesorectal excision is the current standard of treatment for stages II and III. It improves local control and reduces toxicity [2] and

possibly improves disease-free survival compared with postoperative treatment [3]. However, about one-third of patients still develop distant metastases and eventually die of the disease [4]. For this reason, current research is focused on prognostic factors to better identify these patients. To date, pathologic TNM (tumor, node, metastasis) stage and circumferential resection margin status are the most important prognostic factors, but changes due to preoperative treatment have to be considered. Tumour regression grade (TRG) first described by Dworak *et al.* [5] has been correlated with prognosis [6]. TRG is assessed by residual tumour and stromal changes at the site of previous tumours, ranging

Correspondence to: Víctor Moreno García, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain.  
E-mail: victor.mgarca@gmail.com

Presented in part at 2009 ASCO Annual Meeting and XII Congreso Nacional SEOM.

from 4 when no tumour is found to 0 when there is no response at all. However, TRG 2 and 3 determination is semiquantitatively defined as more/less than 50% tumour regression, respectively, and does not correlate with prognosis, possibly because discrimination is largely subjective. In fact, other grading systems have been proposed to categorize tumour regression in three grades where intermediate responders are grouped [7–9].

Molecular markers have been studied to predict response to preoperative treatment with conflicting results. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression has been suggested as a marker of poor response [10] and outcome [11] in preoperative biopsies. Epidermal growth factor receptor (EGFR) has shown varying results, with better response to treatment in EGFR-positive tumours in some studies [10] while favouring EGFR-negative in others [12,13]. Proliferation, apoptosis, 5-fluorouracil metabolism and DNA mismatch repair markers have also been studied, but results are too contradictory to draw definitive conclusions [14]. CD133 is a glycoprotein that has been shown to enrich tumoural samples with cancer-initiating cells in animal models [15]. Recent studies suggest that prognosis is worse in colorectal tumours enriched with CD133-positive tumoural glands [16].

In this study, we sought to define a molecular pattern to better define the responses to preoperative CRT that may correlate with prognosis. For this purpose, we retrospectively analysed immunohistochemical expression of VEGF (vascular endothelial growth factor), EGFR (vascular endothelial growth factor), CD133 antibody, Ki67 antibody and p53 antibody in postoperative surgical specimens from patients with locally advanced rectal cancer and treated with neoadjuvant CRT.

## Method

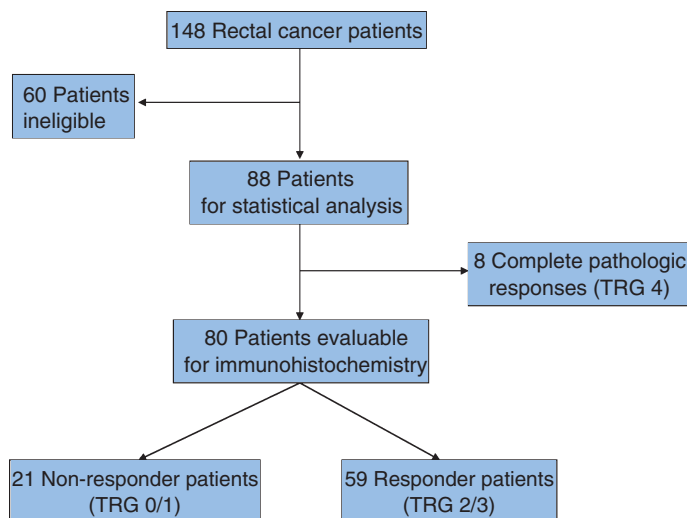
### Patients

Clinical data were retrospectively collected from a database of patients treated for locally advanced rectal cancer at Hospital Universitario La Paz, Madrid (Spain) between 1995 and 2007, until February 2008. From a total of 148 patients, 60 were excluded from the final analysis because of incomplete clinical data or unsuitable pathological samples (Fig. 1). All patients had flexible endoscopy with rectal biopsy performed, and preoperative staging was performed according to the International Union against Cancer classification and carried out by endorectal ultrasonography and/or magnetic resonance imaging (MRI). Chest X-ray and abdominal and pelvic computed tomography (CT) were performed to exclude stage IV tumours.

Preoperative treatment included pelvic radiotherapy (1.8 Gy daily for a total of 50.4 Gy) and concomitant chemotherapy. The chemotherapy regimens were UFT-leucovorin (27 patients), oxaliplatin and raltitrexed (42 patients) or oxaliplatin and capecitabine (19 patients). Surgery was performed 6–8 weeks after completion of radiotherapy and follow-up was scheduled according to the guidelines of the National Comprehensive Cancer Network. A more detailed report of the treatment plan and follow-up has been published [17].

### Tissue samples

Samples from surgical specimens were fixed in formalin and paraffin embedded. Four  $\mu\text{m}$  sections were cut from all specimen blocks and stained with haematoxylin–eosin.



**Figure 1** Flow chart of patients.

The blocks corresponding to the residual primary tumour were evaluated for TRG by two expert pathologists (EB/MAGC) blinded to patient outcome. Discordant results were discussed and agreed on by both investigators. TRG was assessed as defined by Rödel: grade 0/1, no regression, or minor regression (dominant tumour mass with obvious fibrosis in 25% or less of the tumour mass); grade 2, moderate regression (dominant tumour mass with obvious fibrosis in 26–50% of the tumour mass); grade 3, good regression (dominant fibrosis outgrowing the tumour mass, i.e., more than 50% tumour regression); and grade 4, total regression (no viable tumour cells, only fibrotic mass).

### Immunohistochemistry

Immunoreactivity for EGFR, CD133, VEGF, Ki-67 and p53 was evaluated in tissue arrays by immunohistochemistry (IHC). The 88 post-treatment surgical specimens were included in a total of four tissue arrays containing 20 to 35 patients, each duplicated. Sections of 4 µm were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue arrays blocks. Slides were deparaffined and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 10 min at room temperature (RT). Antigens were retrieved by incubation in EDTA for 45 min at 155°C. EGFR immunohistochemistry was performed with the EGFR pharmDx™ kit (Dako, Carpinteria, California, USA) following the manufacturer's protocol. The primary monoclonal antibodies against CD133 [CD133/1 (AC133) pure, human Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany], VEGF (Clone VG1; Dako), Ki-67 (Clone MIB-1; Dako) and p53 (Clone DO-7; Dako) were diluted at 1:100, 1:50, 1/50 and 1/100, respectively, in 1% BSA in TBS. Tissue slides were incubated with the antibody for 30 minutes at RT. Slides were then rinsed in TBS and incubated with the peroxidase-based EnVision™ kit (Dako Corporation) for 30 min at RT. Afterwards, specimens were incubated with diaminobenzidine chromogenic substrate (Dako Corporation) for 5 min at RT. Sections were counterstained with haematoxylin, stepwise dehydrated through graded alcohols and cleared in xylene.

### Evaluation of immunohistochemistry

Tissue microarrays were evaluated for immunoreactivity by two expert surgical pathologists from the hospital (EB/MAGC). EGFR was considered positive when > 5% of tumour cells had membrane and/or cytoplasmic staining [13]. CD133 was considered positive when > 10% of tumour glands were stained [18]. VEGF was considered positive when > 10% of tumour cells were

stained, using endothelial cells as a positive control [12]. Ki67 was considered high when > 30% of tumour cells were stained [19] and p53 when > 50% of tumour cells were stained [20]. Representative micrographs of positive immunostainings for these markers are shown in Figs. S1, S2, S3, S4 and S5.

### Statistical analysis

The study was designed to identify molecular markers correlated with prognosis. Clinical and pathological variables included to rule out confounding factors were age, gender, clinical TNM (tumor, node, metastasis), pathologic TNM, carcinoembryonic antigen, type of surgery, TRG, chemotherapy protocol, distance from anal verge and lymphovascular invasion. Only patients with complete data were included for analysis. A Kappa coefficient was calculated to quantify inter-rater agreement and to compare CD133 expression in TMA with the whole section. Survival rates (DFS and OS) were measured from the time of diagnosis and estimated with the Kaplan–Meier method. Comparisons between curves were evaluated by the log-rank test. Hazard ratios for relapse and their 95% confidence intervals were calculated for all biomarkers. A Cox proportional hazards model adjusted for age, pathologic stage, TRG and CD133 expression in TMA was constructed for multivariate analysis. All patients were included in the multivariate analysis. A *P*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant and all tests were two-tailed. All statistical analyses were carried out using SPSS 15.0 software (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

### Results

Clinicopathological features are summarized in Table 1. Median age was 66 years (34–84). Thirty-four patients (39%) had a clinical stage III tumour. The majority of patients achieved an intermediate response with TRG 2 and TRG 3 in 42 (48%) and 17 (19%) patients, respectively. Eight (10%) patients had a complete pathologic response (TRG 4) and in 21 (24%) no response was found (TRG 0/1). There was a good inter-observer correlation (Kappa: 0.63).

After CRT, the number of positive cases for EGFR, VEGF, CD133, p53 and Ki67 was 17 (19%), 42 (47%), 25 (28%), 49 (55%) and 40 (45%), respectively. We found no differences between the expression of any biomarker and the clinical stage, pathological stage and TRG except for Ki67 that seemed to be higher in tumours with less regression (Table 2). However, the differences between TRG 2 and 3 were not statistically significant (*P* = 0.23).

**Table 1** Clinical characteristics of the 88 patients.

Characteristic	No. of patients (%)
Median age [range]	66 (34–84)
Gender	
Male	49 (56)
Female	39 (44)
Clinical tumour classification	
T2	15 (17)
T3	63 (72)
T4	8 (9)
Unknown	2 (2)
Clinical lymph node classification	
N0	53 (60)
N1	31 (35)
N2	3 (3)
Unknown	1 (1)
Median pretreatment serum CEA level [range], ng/ml	3.1 (0.5–67)
Surgery	
Low anterior resection	46 (52)
Abdominoperineal resection	39 (44)
Local excision	3 (3)
Concurrent chemotherapy	
UFT-LV	27 (31)
TOMOX	42 (48)
XELOX	19 (22)
Pathologic stage	
0	8 (9)
I	23 (26)
II	30 (34)
III	27 (31)
Tumour regression grade	
0/1	21 (24)
2	42 (48)
3	17 (19)
4	8 (9)

### Survival analysis

After a median follow-up time of 40 (5–127) months, 16 patients developed distant metastases (18%), 12 (13%) local recurrence only and 7 (8%) both local and distance recurrence. To date, 22 (25%) patients have died. Overall, 3- year DFS and OS was 57% (95% CI, 46–69%) and 82% (95% CI, 73–91), respectively.

The pathologic stage of the primary tumour was correlated with outcome in terms of 3 -year DFS and 3 -year OS (Table 3). TRG was also associated with longer 3- year DFS, ranging from 38% for TRG 0/1 to 100% for TRG 4 ( $P = 0.05$ ), although results for intermediate responders were almost identical (59% and 62% for TRG 2 and 3, respectively). The 3 -year OS according to TRG gave similar results, 54% (TRG 0/1), 86% (TRG 2), 92% (TRG 3) and 100% (TRG 4) ( $P = 0.004$ ).

### Biomarker expression in TMA and outcome

When the entire cohort of patients was analysed, no significant correlation was found for any biomarker (Fig. 2), although CD133-positive tumours showed a trend towards fewer recurrences (3- year DFS 63% *vs* 43% for CD133 positive and negative, respectively) ( $P = 0.09$ ) (Table 4). When the analysis was limited to intermediate responders (TRG 2 and 3), the trend towards worse prognosis was maintained for CD133-negative tumours in terms of 3- year DFS (40% *vs* 74%;  $P = 0.08$ ) [HR = 2.38; 95% CI 0.8–6.6]. The 3- year OS was 81% for CD133 negative and 92% for CD133 positive ( $P = 0.17$ ) [HR = 3.9; 95% CI 0.5–33] (Fig. 3a,c).

In the multivariate analysis, CD133 expression was an independent predictor for DFS with a HR = 2.22 (95%CI: 0.99–4.99,  $P = 0.05$ ) for negative tumours. An increment in pathologic stage was also statistically significant (HR = 1.91; 95% CI: 1.12–3.26,  $P = 0.01$ ) (Table 5).

### CD133 expression

Of the 59 patients with intermediate response, 16 had no remaining tumour, 43 were available for CD133 analysis of the whole section and in 34 patients, both TMA and the whole section could be directly compared. The correlation with the results obtained in TMA was moderate (Kappa = 0.54) (Table 6). As seen in Fig. 3b,d, the trend towards differences in DFS and OS disappeared, and we could not confirm prognostic subgroups according to CD133 expression in the whole section.

### Discussion

The aim of this study was to identify molecular biomarkers that could help to predict patient outcome after CRT. However, the impact of treatment in tumour regression cannot be disregarded because complete tumour regression is clearly correlated with a good outcome and the absence of response is correlated with a poor outcome [6,21]. That is why we sought to define a molecular pattern to stratify intermediate responders into more accurate prognostic groups.

Several strategies have been used to find molecular markers in rectal cancer, most of them in pretreatment biopsies, to predict response to neoadjuvant treatment. Gene expression profiles have shown some value in that field [22–24]; however, these techniques require snap fresh samples and their clinical availability is, to date, uncertain. On the other hand, immunohistochemistry is widely used in molecular diagnostics and could offer the advantage of easy translation to clinical use of the new

**Table 2** Immunohistochemical expression after chemoradiotherapy and correlation with clinicopathological variables.

	CD133		EGFR		VEGF		P53		Ki67	
	+	–	+	–	+	–	+	–	High	Low
All (%)*	25 (36)	43 (63)	17 (26)	48 (74)	42 (60)	28 (40)	49 (74)	17 (26)	40 (59)	28 (41)
Clinical stage (%)										
I	0 (0)	4 (100)	1 (33)	2 (67)	3 (60)	2 (40)	3 (100)	0 (0)	3 (75)	1 (25)
II	16 (41)	23 (59)	10 (26)	29 (74)	25 (63)	15 (37)	27 (67)	13 (33)	23 (60)	15 (40)
III	9 (34)	16 (64)	6 (26)	17 (74)	14 (56)	11 (44)	19 (83)	4 (17)	14 (54)	12 (46)
Pathologic stage (%)										
I	7 (37)	12 (63)	5 (33)	10 (67)	13 (65)	7 (35)	10 (59)	7 (41)	14 (78)	4 (22)
II	10 (38)	16 (62)	6 (22)	21 (78)	15 (52)	14 (48)	21 (77)	6 (23)	13 (50)	13 (50)
III	8 (35)	15 (65)	6 (26)	17 (74)	14 (67)	7 (33)	18 (82)	4 (18)	13 (54)	11 (46)
TRG† (%)										
0/1	8 (36)	15 (68)	8 (40)	12 (60)	16 (67)	8 (33)	19 (90)	2 (10)	18 (86)	3 (14)
2	14 (38)	23 (62)	9 (26)	25 (73)	16 (52)	15 (48)	23 (70)	10 (30)	19 (51)	18 (49)
3	3 (37)	5 (62)	0	11 (100)	10 (67)	5 (33)	7 (58)	5 (42)	3 (30)	7 (70)

\*Cases lost because of complete regression (TRG 4), very few cells (some TRG 3) and processing losses.

†Differences are statistically significant for Ki67 ( $P = 0.005$ ).

**Table 3** Univariate analysis.

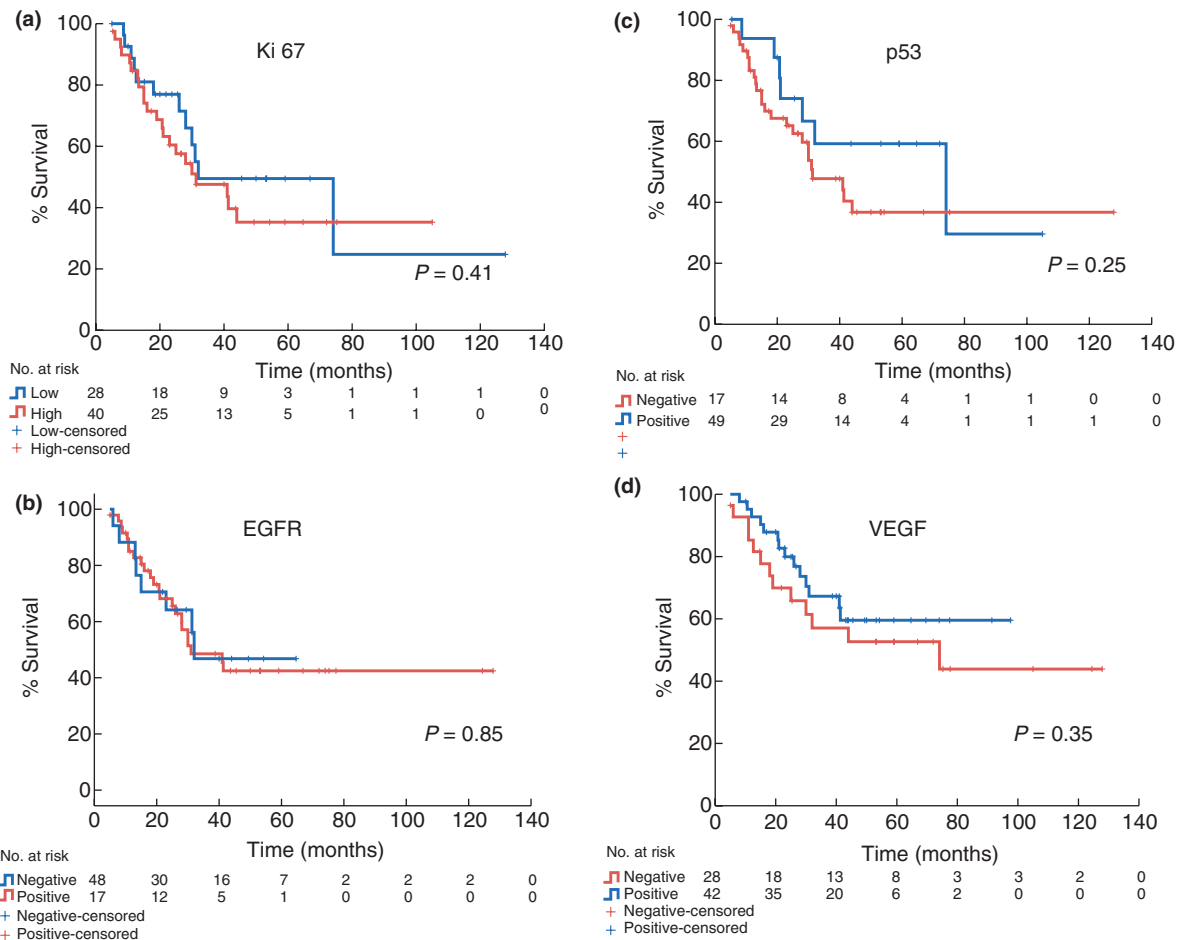
Factor	No. of patients	3- year DFS (%) (95% CI)	$P$	3- year OS (%) (95% CI)	$P$
All	88	57 (46–69)		82 (73–91)	
AJCC TNM pathologic stage					
0	8	100 (–)	0.05	100 (–)	0.07
1	23	69 (50–88)		100 (–)	
2	29	53 (34–72)		76 (60–93)	
3	27	44 (25–63)		72 (53–91)	
Tumour regression grade					
0/1	21	38 (15–61)	0.05	54 (30–78)	0.005
2	42	59 (42–75)		90 (80–100)	
3	17	62 (39–85)		93 (80–100)	
4	8	100 (–)		100 (–)	
TRG IHQ					
0/1	21	38 (15–61)	0.029	54 (30–78)	0.004
2/3 CD133–	28	41 (20–62)		86 (71–100)	
2/3 CD133+	17	74 (52–96)		92 (77–100)	
4	8	100 (–)		100 (–)	

prognostic markers defined. The subjectivity of immunohistochemical scoring is a limitation when using this method; however, the semi-quantitative assessment of protein expression as percentage of positive cells, rather than staining intensity, has shown to be highly reproducible between observers [25]. Another major source of discrepancy is the cut-off score selected to associate protein markers with clinicopathological endpoints. Zlobec *et al.* [10] have proposed an ROC curve-derived cut-off score, although this selection will always require further independent validation. For this reason, we used

previously defined cut-off scores so our work could serve as an independent validation.

It is noteworthy that we obtained a good correlation between observers (Kappa 0.63) probably because of low cut-off scores (10% for CD133 and VEGF, and 5% for EGFR).

Human CD133 (human prominin-1) is a five transmembrane domain glycoprotein, originally discovered as a target of a monoclonal antibody, AC133, which is generated to bind CD34+ hematopoietic stem cells. *In vitro* proliferation assays and *in vivo* tumour initiation



**Figure 2** Disease-free survival according to biomarker expression in tissue microarrays for all patients.

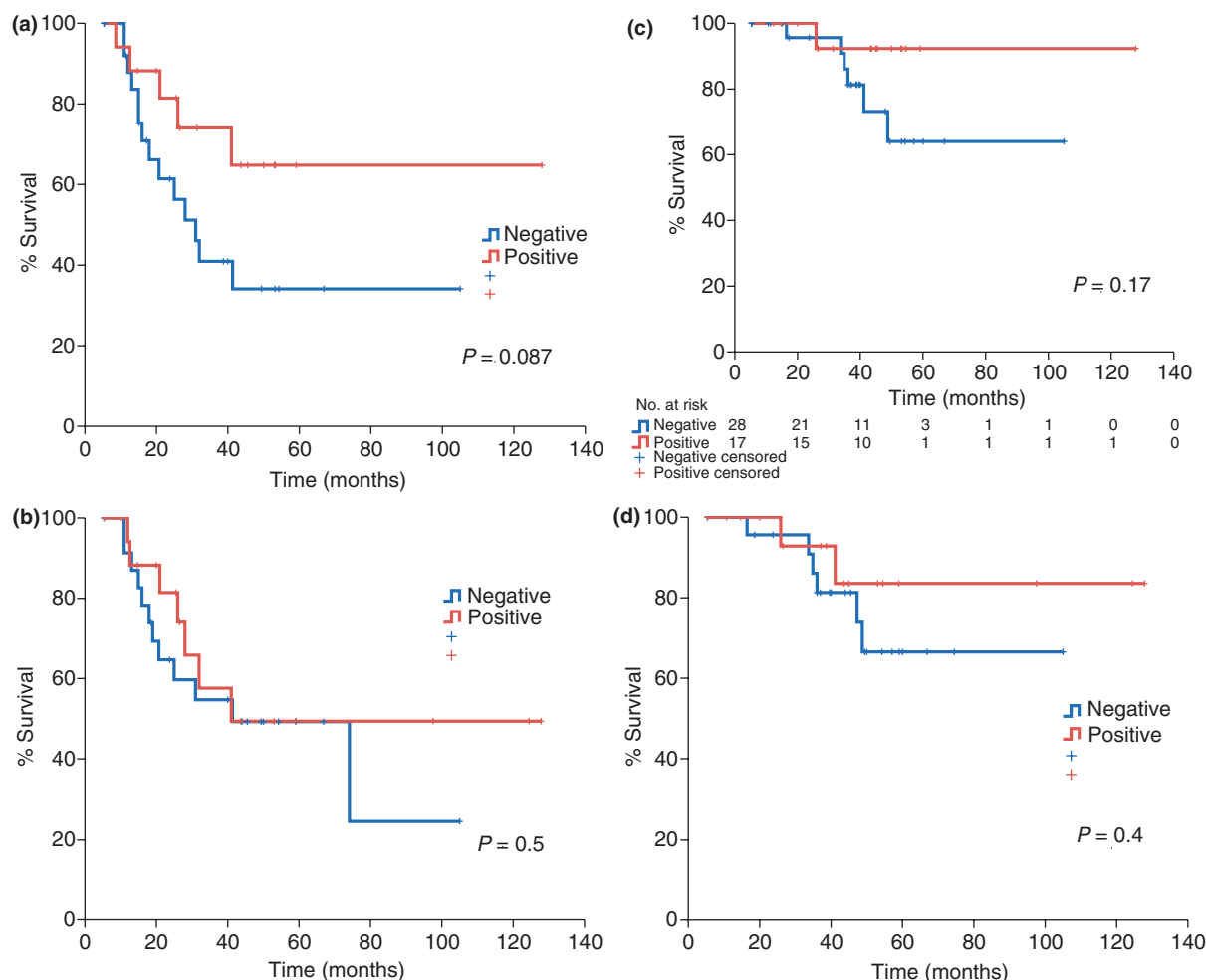
experiments carried out with AC133 epitope-positive cells isolated from both primary tumours and cancer cell lines have provided evidence for the existence of CD133 epitope-expressing tumour-initiating cell populations in colorectal cancer [15,26]. The use of this antibody immunohistochemically to find tumour-initiating cells on site is inconclusive. The theoretical distribution of tumour-initiating cells at crypt bottoms [27,28] and their inherent asymmetrical division makes it difficult to correlate with the staining distribution of CD133 in the glandular-luminal surface of all tumour cells in some glands. Regardless of the biological significance, the clinical impact of CD133 after CRT cannot be ignored. Although studies in untreated colorectal cancer showed no prognostic significance for CD133 immunohistochemistry [29,30], two recent publications have suggested that residual CD133-positive cells assessed by IHQ [18] or mRNA expression [31] after CRT correlate with low patient survival. Surprisingly, we obtained opposite results for intermediate responders with 3-year DFS and

OS of 74% and 92% for CD133 positive compared to 40% and 81% for CD133 negative, with differences close to statistical significance ( $P = 0.08$  and  $P = 0.17$ , respectively). For this reason, we sought to validate CD133 expression in TMA by analysing the whole section.

There was a moderate correlation between the whole section and the TMA, and the prognostic impact was lost. It is possible that the false-negative cases obtained in TMA biased the result towards a worst prognosis for negative cases. Whether this prognostic impact would remain in a larger series remains unknown, but the heterogeneous staining pattern of CD133 could explain the inconsistency and the nonrepresentative sample of TMA.

The anti-CD133 antibody used in our study was previously validated by other authors [16,30], and though it is different from that used by Wang, the pattern of staining was similar. It is reasonable to believe that CD133 immunohistochemistry may not be pinpointing tumour initiating cells, but instead some other





**Figure 3** Disease-free survival and overall survival according to CD133 expression in TMA and whole sections for intermediate responders (TRG 2 and 3). Disease-free survival according to CD133 assessed by tissue microarray (a) or whole section (b). Overall survival according to CD133 assessed by tissue microarray (c) or whole section (d).

related pathway status implicated in cell metabolism, tumour growth, invasiveness or angiogenesis [32]. It is known that mTOR pathway plays a critical role in CD133 transcription. An up-regulation of the pathway results in down-regulation of CD133 expression at both mRNA and protein levels, which are directly driven by HIF-1 alpha [33]. Over-expression of HIF-1 alpha results in VEGF transcription, which is associated with greater tumour aggressiveness, poor survival and metastatic disease [34]. This status may reflect a more aggressive subset of tumours with up-regulation of mTOR after responding to initial treatment. It has been even suggested that CD133-negative cells are capable of initiating tumours that are even more aggressive than CD133-positive cells in a murine model [35].

However, other possibilities cannot be discarded, such as that CD133 negativity may reflect a more undifferen-

tiated state at the front of invasion where tumour cells are known to almost always be CD133 negative [16]. In addition to the biological plausibility of the interaction between CD133 and VEGF, in our study, we found neither a correlation of both markers (data not shown) nor any prognostic significance for VEGF. In two similar studies [12,31], the results were identical, suggesting that VEGF status in post-treatment samples has no relevance to patient outcomes. However, in untreated biopsies, it seems to be associated with nodal metastases [36] and poor DFS [11].

The prognostic significance of EGFR has also been frequently assessed, with discordant results. In pretreatment biopsies, Zlobec *et al.* [10] found a worse outcome for patients who were EGFR negative, while Kim *et al.* [37] found opposite results. In the post-treatment samples, disparities have occurred as well. Bertolini *et al.*

**Table 4** Correlation between biomarker expression and outcome.

Biomarker	No. of patients	3-year DFS (%) (95% CI)	P
CD133			
Positive	25	63 (42–83)	0.09
Negative	43	43 (25–60)	
EGFR			
Positive	17	47 (21–72)	0.85
Negative	48	48 (33–64)	
VEGF			
Positive	42	67 (52–83)	0.35
Negative	28	57 (37–76)	
p53			
Positive	49	48 (32–64)	0.25
Negative	17	59 (33–84)	
Ki67			
High	40	48 (31–65)	0.40
Low	28	49 (27–71)	

**Table 5** Multivariate analysis for disease-free survival (DFS).

	HR	95% CI	P
Age ( $\leq 65$ vs $> 65$ )	1.54	0.75–3.13	0.23
Pathologic stage (increment)	1.91	1.12–3.26	0.01
TRG (increment)	0.66	0.37–1.17	0.16
CD 133* (negative vs positive)	2.22	0.99–4.99	0.05

\*Assessed in tissue microarray.

**Table 6** Correlation between CD133 expression in tissue microarray (TMA) and whole section.

	TMA CD133 positive	TMA CD133 negative
CD133 positive*	11	5
CD133 negative*	3	17

\*Assessed in the whole section. Kappa index = 0.54.

[12] found a worse outcome for EGFR-positive tumours, but Giralt *et al.* [13] did not report any prognostic impact. Similarly, we did not find any correlation between EGFR and prognosis for the entire cohort.

We also included p53 and ki67 because of their routine use in pathology, which makes them extremely helpful for daily implementation. Unfortunately, as in previous studies, they did not provide additional information [38–40].

Some limitations to our study include the retrospective design and the heterogeneous chemotherapy protocols, although the radiotherapy schedule was uniform. The sample size may have influenced the results but was sufficient to find differences with suggested hazard ratios in a previous study for CD133-positive tumours of 6.8 and 5.3 for DFS and OS, respectively [18].

In conclusion, our study failed to confirm the prognostic significance of any biomarker analysed in rectal cancer after chemoradiotherapy, difficulties persist in finding new prognostic factors. The trend towards prognostic differences found for CD133 expression in TMA could not be confirmed when examining the whole section, probably because of heterogeneous staining. These results highlight the importance of validation for new techniques before drawing conclusions from retrospective studies and the risk of extrapolating the validity in TMA of well-known IHQ markers to new ones.

## Funding

VMG is supported by Fundación Para la Investigación Biomédica del Hospital La Paz (FIBHULP) Grant: REX 09.

## References

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E *et al.* Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; **59**: 225–49.
- 2 Sauer R, Becker H, Hohenberger W *et al.* Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; **351**: 1731–40.
- 3 Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ *et al.* Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5124–30.
- 4 Bosset JF, Collette L, Calais G *et al.* Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1114–23.
- 5 Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997; **12**: 19–23.
- 6 Rodel C, Martus P, Papadopoulos T *et al.* Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 8688–96.
- 7 Beddy D, Hyland JM, Winter DC *et al.* A simplified tumor regression grade correlates with survival in locally advanced rectal carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2008; **15**: 3471–7.
- 8 Ryan R, Gibbons D, Hyland JM *et al.* Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology* 2005; **47**: 141–6.



- 9 Wheeler JM, Dodds E, Warren BF *et al.* Preoperative chemoradiotherapy and total mesorectal excision surgery for locally advanced rectal cancer: correlation with rectal cancer regression grade. *Dis Colon Rectum* 2004; **47**: 2025–31.
- 10 Zlobec I, Vuong T, Compton CC *et al.* Combined analysis of VEGF and EGFR predicts complete tumour response in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Br J Cancer* 2008; **98**: 450–6.
- 11 Giralt J, Navalpotro B, Hermosilla E *et al.* Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclo-oxygenase-2 in patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Oncology* 2006; **71**: 312–9.
- 12 Bertolini F, Bengala C, Losi L *et al.* Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; **68**: 1455–61.
- 13 Giralt J, de las HM, Cerezo L *et al.* The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiation Oncol* 2005; **74**: 101–8.
- 14 Smith FM, Reynolds JV, Miller N, Stephens RB, Kennedy MJ. Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2006; **32**: 55–64.
- 15 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; **445**: 111–5.
- 16 Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008; **99**: 1285–9.
- 17 Moreno García V, Cejas P, Blanco CM *et al.* Prognostic value of carcinoembryonic antigen level in rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Colorectal Dis* 2009; **24**: 741–8.
- 18 Wang Q, Chen ZG, Du CZ *et al.* Cancer stem cell marker CD133+ tumour cells and clinical outcome in rectal cancer. *Histopathology* 2009; **55**: 284–93.
- 19 Fernebro E, Bendahl PO, Dictor M *et al.* Immunohistochemical patterns in rectal cancer: application of tissue microarray with prognostic correlations. *Int J Cancer* 2004; **111**: 921–8.
- 20 Spitz FR, Giacco GG, Hess K *et al.* p53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997; **3**: 1685–90.
- 21 Wiig JN, Larsen SG, Dueland S, Giercksky KE. Clinical outcome in patients with complete pathologic response (pT0) to preoperative irradiation/chemo-irradiation operated for locally advanced or locally recurrent rectal cancer. *J Surg Oncol* 2005; **92**: 70–5.
- 22 Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ *et al.* Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 1826–38.
- 23 Kim IJ, Lim SB, Kang HC *et al.* Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007; **50**: 1342–53.
- 24 Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T *et al.* Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res* 2006; **66**: 3370–4.
- 25 Zlobec I, Terracciano L, Jass JR, Lugli A. Value of staining intensity in the interpretation of immunohistochemistry for tumor markers in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2007; **451**: 763–9.
- 26 O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; **445**: 106–10.
- 27 Barker N, Ridgway RA, van Es JH *et al.* Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 2009; **457**: 608–11.
- 28 Johnston MD, Edwards CM, Bodmer WF, Maini PK, Chapman SJ. Mathematical modeling of cell population dynamics in the colonic crypt and in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 4008–13.
- 29 Choi D, Lee HW, Hur KY *et al.* Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 2258–64.
- 30 Kojima M, Ishii G, Atsumi N *et al.* Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci* 2008; **99**: 1578–83.
- 31 Yasuda H, Tanaka K, Saigusa S *et al.* Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep* 2009; **22**: 709–17.
- 32 Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med* 2008; **86**: 1025–32.
- 33 Matsumoto K, Arao T, Tanaka K *et al.* mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. *Cancer Res* 2009; **69**: 7160–4.
- 34 Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. Angiogenesis in colorectal cancer: prognostic and therapeutic implications. *Am J Clin Oncol* 2006; **29**: 408–17.
- 35 Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT *et al.* CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and C. *J Clin Invest* 2008; **118**: 2111–20.
- 36 Moehler M, Frings C, Mueller A *et al.* VEGF-D expression correlates with colorectal cancer aggressiveness and is downregulated by cetuximab. *World J Gastroenterol* 2008; **14**: 4156–67.
- 37 Kim JS, Kim JM, Li S *et al.* Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; **66**: 195–200.
- 38 Allegra CJ, Parr AL, Wold LE *et al.* Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53,

and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 1735–43.

- 39 Lin LC, Lee HH, Hwang WS *et al.* p53 and p27 as predictors of clinical outcome for rectal-cancer patients receiving neoadjuvant therapy. *Surg Oncol* 2006; **15**: 211–6.
- 40 Morgan M, Koorey D, Painter D *et al.* p53 and DCC immunohistochemistry in curative rectal cancer surgery. *Int J Colorectal Dis* 2003; **18**: 188–95.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1** Apical membrane and intraluminal secretions immunostaining for CD133 in tumor cells.

**Figure S2** Complete membrane immunostaining for EGFR in some tumor cells.

**Figure S3** Cytoplasmic immunostaining for VEGF in tumor cells.

**Figure S4** Nuclear immunostaining for p53 in tumor cells.

**Figure S5** Nuclear staining for Ki-67 in tumor cells.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

# Prognostic value of carcinoembryonic antigen level in rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy

V. Moreno García · P. Cejas · M. Blanco Codesido · J. Feliu Batlle ·  
J. de Castro Carpeño · C. Belda-Iniesta · J. Barriuso · J. J. Sánchez · J. Larrauri ·  
M. González-Barón · E. Casado

Accepted: 19 February 2009  
© Springer-Verlag 2009

## Abstract

**Background** The purpose of this study was to identify clinical and pathological parameters to improve prediction of disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer.

**Methods** Between July 1995 and May 2007, 148 patients with primary rectal adenocarcinoma received neoadjuvant chemoradiotherapy followed by mesorectal excision. Pre-

operative treatment included various protocols, UFT and leucovorin (28%) and oxaliplatin-based chemotherapy (72%). Clinical and pathological variables were evaluated in relation to patient outcomes.

**Results** Thirteen percent of patients achieved a complete pathologic response. No response or minimal response as defined by Dworak (Tumor Regression Grade 0/1) was observed in 30 patients (20%). At a median follow-up of 37 months, the 3-year DFS and OS were 64% and 83%, respectively. Pre-treatment serum carcinoembryonic antigen (CEA) level  $\leq 2.5$  ng/ml was associated with higher DFS (74 vs. 53%;  $p=0.018$ ), higher complete pathologic responses (21 vs. 9%;  $p=0.05$ ), and less recurrences (24 vs. 44%;  $p=0.014$ ).

**Conclusion** The data suggest that a CEA level  $\leq 2.5$  ng/ml might be a predictor not only of tumor response, as has been suggested before, but also of DFS. This finding could be useful in the future to predict individual risk and to develop more aggressive or alternative strategies.

Supported in part by Biomedical Research Foundation, University Hospital La Paz.

All authors have no financial disclosures.

V. Moreno García · P. Cejas · M. Blanco Codesido ·  
J. Feliu Batlle · J. de Castro Carpeño · C. Belda-Iniesta ·  
J. Barriuso · M. González-Barón  
Service of Medical Oncology, University Hospital La Paz,  
Madrid, Spain

J. J. Sánchez  
Department of Preventive Medicine, School of Medicine,  
Universidad Autónoma de Madrid,  
Madrid, Spain

J. Larrauri  
Service of Pathology, University Hospital La Paz,  
Madrid, Spain

E. Casado  
Department of Medical Oncology, Hospital Infanta Sofía,  
Madrid, Spain

V. Moreno García (✉)  
Paseo de la Castellana 261,  
28046 Madrid, Spain  
e-mail: victor.mgarc@gmail.com

**Keywords** Carcinoembryonic antigen ·  
Neoadjuvant therapy · Radiation therapy · Rectal cancer ·  
Tumor regression grade

## Introduction

Preoperative chemoradiotherapy (CRT) is the current standard treatment for locally advanced rectal cancer. It improves local control and reduces toxicity in patients in stages II and III according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC). The European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) trial also demonstrated a less advanced pathologic tumor stage and pathological tumor status after preoperative CRT. However,

there is no solid evidence that the chances of sphincter preservation can be substantially improved after neoadjuvant chemotherapy [1–3].

The most important predictor of survival is the pathologic stage; however, this might be altered by preoperative treatment. Tumor regression grade (TRG) is thought to be an independent prognostic factor. It is assessed by residual tumor, stromal changes such as fibrosis and mucin pools at the site of previous tumors. Several studies correlate TRG and disease-free survival (DFS), but it is not clear whether any improvement is due to pathologic stage or tumor regression itself (there is no effect on DFS when TRG is stratified by pathologic stage) [4–6]. Only complete pathologic tumor regression is clearly correlated with higher DFS.

At the baseline moment of cancer diagnosis, clinical factors in RC poorly predict DFS after CRT. Tumor circumference and distance from anal verge have been reported to correlate with tumor response [7], but results are contradictory [8]. Serum carcinoembryonic antigen (CEA) level could be the most important clinical predictor of tumor response, as a surrogate marker of DFS. However, CEA's capacity for DFS prediction has not been previously shown. Another conflict that arises concerning serum CEA level is the cut-off point for prediction, which

is not clear as some studies propose 5 ng/ml and others 2.5 ng/ml [7, 8].

Predictive factors can help clinicians make treatment decisions and design follow-up strategies. Studies in this setting have correlated clinical parameters with tumor response but not directly with DFS. Hence, we performed this retrospective study to correlate clinical factors and pathologic tumor response with DFS in the neoadjuvant setting of RC.

## Patients and methods

### Patients

Between July 1995 and May 2007, 148 patients with primary rectal adenocarcinoma with no evidence of metastasis received neoadjuvant chemoradiotherapy followed by mesorectal excision at La Paz University Hospital in Madrid (Spain). Medical records and tissue samples were retrospectively reviewed for this study. All patients underwent flexible endoscopy with rectal biopsy, complete blood count, biochemical profile, and serum CEA level tests. Chest X-ray, abdominal and pelvic computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), and/or endo-

**Table 1** Clinical characteristics of 148 patients

Characteristic	No. of patients (%)
Median age [range]	65 [34–84]
Gender	
Male	82 (55)
Female	66 (46)
Clinical tumor classification	
T2	25 (17)
T3	102 (69)
T4	12 (8)
Unknown	9 (6)
Clinical lymph node classification	
N0	85 (57)
N1	57 (38)
N2	3 (2)
Unknown	3 (2)
Median distance from anal verge [range], cm	5 [0–15]
Median pre-treatment serum CEA level [range], ng/ml	2.8 [0–239]
Median pre-treatment platelet level	240,000 [27,000–1,066,000]
Surgery	
Low anterior resection	74 (50)
Abdominoperineal resection	69 (46)
Local excision	5 (3)
Concurrent chemotherapy	
UFT–LV	42 (28)
Oxaliplatin-based	106 (72)

CEA carcinoembryonic antigen,  
UFT–LV UFT and leucovorin

scopic ultrasound were performed to exclude TNM stage I and IV tumors [9]. Clinical parameters are shown in Table 1.

### Treatment

Preoperative radiotherapy was delivered in fractions of 1.8 Gy to reach a dose of 45 Gy, followed by a boost of 5 Gy. All patients underwent CT simulation for three-dimensional conformal radiotherapy planning and the three-field technique (one posterior field and two lateral fields). The boost field included the gross tumor volume and the mesorectum with security margins in all directions.

Preoperative chemotherapy included various protocols. Forty-two patients (28%) received UFT (300 mg/m<sup>2</sup> on days 1–14 concurrent with radiotherapy and then 390 mg/m<sup>2</sup> in 28-day cycles) and leucovorin (250 mg/m<sup>2</sup> on day 1 and 7.5 mg/m<sup>2</sup>/12 h on days 2–14) [10]. One hundred and six patients received oxaliplatin-based chemotherapy with 72 patients (49%) receiving raltitrexed (3 mg/m<sup>2</sup>) and oxaliplatin (130 mg/m<sup>2</sup>) every 3 weeks, and 34 patients (23%) receiving capecitabine (825 mg/m<sup>2</sup> daily with radiotherapy and then 2,000 mg/m<sup>2</sup> days 1–14) and oxaliplatin (130 mg/m<sup>2</sup>) every 3 weeks.

Surgery was performed 6 to 8 weeks after completion of radiotherapy. Seventy-four (50%) underwent a low anterior resection, 69 (46%) underwent an abdominoperineal resection, and five (3%) a local excision. Total mesorectal excision was routinely performed.

### Pathologic assessment

Samples from surgical specimens were fixed in formalin and paraffin embedded. Six-micrometer sections were cut and stained with hematoxylin–eosin and examined by a pathologist. The tumors were staged according to the pTNM of the AJCC. All slides were reviewed for this study by an expert pathologist (J.L.) to assess TRG as described by Dworak [11]: Grade 0: no regression; Grade 1: minor tumor regression (dominant tumor mass with obvious fibrosis and/or vasculopathy); Grade 2: dominantly fibrotic changes with few tumor cells, easy to find; Grade 3: major regression, very few (difficult to find microscopically) tumor cells in fibrotic tissue with or without mucous substance; Grade 4: complete pathologic response (no tumor cells, only fibrotic changes).

### Follow-up

Follow-up occurred at 3-month intervals for 2 years, 6-month intervals the third year, and yearly thereafter. Evaluations consisted of anamnesis, physical examination, and blood tests, including CEA measurements. Complete

colonoscopy, chest radiography, abdominal ultrasound, and abdominopelvic CT were also scheduled according to the guidelines of National Comprehensive Cancer Network. Local and distance recurrence was histologically confirmed whenever possible. Alternate criteria included sequential enlargement of a mass or distant nodules in radiologic studies.

### Statistical analysis

The study was designed to identify clinical and pathological variables that could predict more favorable outcomes in terms of DFS and overall survival (OS). The following parameters were evaluated: gender, pathological T classification, type of chemotherapy, pathological lymph node classification, TNM pathological stage, TRG, and distance from anal verge ( $\leq 5$  cm vs.  $> 5$  cm.). Carcinoembryonic antigen levels were tested with two cut-off points: the normal range (0–5 ng/ml) and 0–2.5 ng/ml, which was recently described as a predictor of tumor response. A receiver operating characteristic (ROC) curve was performed to determine sensitivity and specificity for both cut-off points. DFS and OS were measured from the time of diagnosis. For dichotomous variables, the Fisher's exact test was used. To determine differences in DFS and OS, univariate analyses were performed according to the Kaplan–Meier method. Comparisons between curves were

**Table 2** Pathologic findings after chemoradiotherapy

Characteristic	No. of patients (%)
Pathologic stage	
0	20 (13)
1	39 (26)
2	46 (31)
3	43 (30)
ypT	
0	22 (15)
1	13 (8)
2	32 (22)
3	76 (51)
4	5 (3)
ypN	
0	102 (71)
1	31 (21)
2	11 (7)
NA	4 (3)
Tumor regression grade	
0/1	30 (20)
2	64 (43)
3	34 (23)
4	20 (13)

evaluated by the log-rank test, and a  $p$  value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. Cox regression was used for the multivariate analysis without variable selection method.

## Results

### Pathologic findings

Among the 148 patients, 20 (13%) had a complete pathologic response. Two patients had a complete pathologic response of the primary tumor (ypT0), although disease remained in nodes classified as stage III. Thirty-nine patients (26%) had a pathologic stage I, 46 (31%) had

a pathologic stage II, and 43 (30%) had a pathologic stage III. The rest of the parameters for primary tumor (ypT) and nodes (ypN) are listed in Table 2. No response or minimal response (TRG 0/1) of the primary tumor was observed in 30 patients (20%); moderate response (TRG 2) was observed in 64 patients (43%) and positive response (TRG 3) was observed in 34 patients (23%).

### Survival analysis

At a median follow-up of 37 months (range 5–127), 29 patients developed distant metastases (19.6%), 17 (11%) local recurrence only, and eight (5%) local and distance recurrence. To date, 34 (23%) patients have died; 31 (21%) due to disease progression, one due to another tumor, and

**Table 3** Impact of different clinical and pathologic factors on 3-year outcome

Factor	No. of patients	Median DFS [95% CI]	3-year DFS (%) [95% CI]	$p$	Median OS [95% CI]	3-year OS (%) [95% CI]	$p$
All	148	NR	62 [52–70]		NR	83 []	
Sex							
Male	82	NR	63 [51–75]	0.739	99 [15–183]	84 [74–93]	0.976
Female	66	NR	59 [46–72]		NR	81 [71–91]	
ypT							
T0	22	NR	90 [78–100]	<0.001	NR	95 [87–100]	<0.001
T1	13	NR	100 [–]		NR	100 [–]	
T2	32	NR	74 [57–91]		NR	100 [–]	
T3	76	31 [26–35]	42 [30–55]		99 [26–173]	72 [61–83]	
T4	5	44 [–]	75 [32–100]		45 [–]	53 [5–100]	
ypN							
N0	101	NR	71 [60–81]	<0.001	NR	88 [80–95]	0.004
N+	42	28 [15–40]	40 [23–56]		77 [25–130]	69 [53–84]	
AJCC TNM pathologic stage							
0	20	NR	89 [75–100]	<0.001	NR	95 [85–100]	0.002
1	39	NR	80 [66–95]		NR	100 [–]	
2	46	44 [–]	55 [39–71]		NR	78 [65–91]	
3	43	28 [15–41]	42 [25–58]		77 [25–130]	70 [54–85]	
Tumor regression grade							
0/1	30	31 [12–50]	48 [28–69]	0.038	45 [–]	60 [40–80]	0.005
2	64	44 [–]	56 [43–70]		NR	84 [74–94]	
3	34	NR	68 [50–85]		77 [42–112]	93 [84–100]	
4	20	NR	89 [75–100]		NR	95 [85–100]	
Distance from anal verge							
≤5 cm	77	NR	63 [51–74]	0.823	NR	83 [75–100]	0.958
>5 cm	71	74 [28–119]	60 [46–72]		99 [–]	82 [72–93]	
CEA level							
0–5 ng/ml	88	NR	65 [54–76]	0.178	NR	85 [77–94]	0.265
>5 ng/ml	60	NR	56 [42–70]		99 [49–150]	79 [67–90]	
CEA level							
0–2.5 ng/ml	58	NR	74 [61–87]	0.015	NR	90 [81–98]	0.097
>2.5 ng/ml	90	44 [9–79]	53 [41–65]		99 [56–143]	79 [69–88]	

CI confidence interval, NR not reached, AJCC American Joint Committee of Cancer, CEA carcinoembryonic antigen, DFS disease-free survival, OS overall survival



two due to surgical complications. Overall, 3-year DFS and OS was 64% and 83%, respectively.

A significant correlation was found between tumor pathologic characteristics (ypT, ypN, and AJCC pathologic stage) and DFS and OS (Table 3). Tumor regression grade was also associated with longer DFS ranging from 48% for TRG 0/1 to 89% for TRG 4 ( $p=0.038$ ) (Table 3 and Fig. 1). Three-year OS was also improved with higher TRG ( $p=0.005$ ) because of a high mortality rate with non-responsive tumors (TRG 0/1=60% and TRG 2, 3, and 4=84%, 93%, and 95%, respectively). When TRG was stratified by AJCC pathologic stage, statistically significant differences were found in stage II (3-year DFS for TRG 1, 2, and 3=27%, 64%, and 62%, respectively;  $p=0.022$ ) but not in stage III (3-year DFS for TRG 1, 2, and 3=29%, 33%, and 67%, respectively;  $p=0.136$ ).

No correlation was found between gender, distance from anal verge or chemotherapy used (data not shown in Table 3), and DFS or OS.

#### CEA levels and outcomes

The sensitivity and specificity for 2.5 ng/ml were 72% and 50% for relapse and 75% and 47% for death. For 5 ng/ml, sensitivity and specificity were 45% and 68% for relapse and 51% and 67% for death, respectively. When the cut-off point of 5 ng/ml was used, no correlation between 3-year DFS or OS was found (Table 3). Nevertheless, the 2.5 ng/ml cut-off point did show a significant correlation with 3-year DFS (74% vs. 53% for 0–2.5 ng/ml and >2.5 ng/ml, respectively;  $p=0.015$ ) (Fig. 2). Three-year OS was 90% (0–2.5 ng/ml) and 78% (>2.5 ng/ml;  $p=0.091$ ).

#### Disease Free Survival According to Tumor Regression Grade

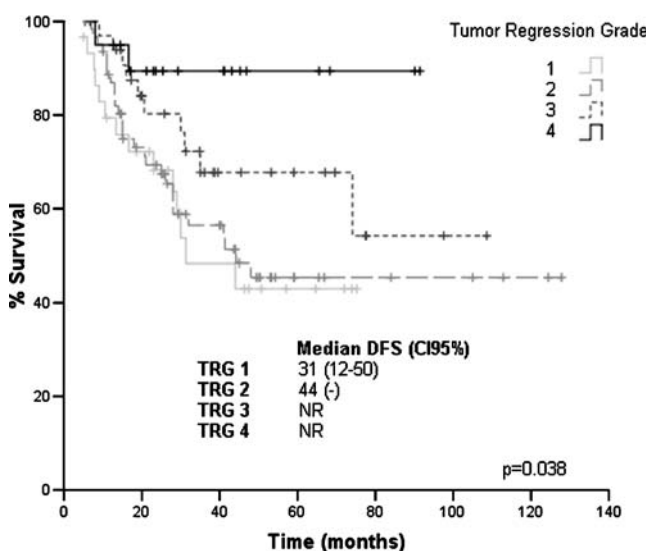


Fig. 1 Disease-free survival according to tumor regression grade

#### Disease Free Survival According to CEA levels

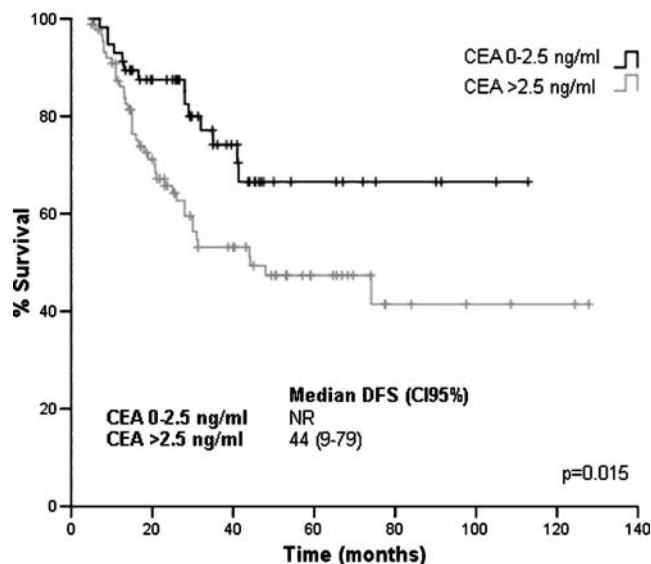


Fig. 2 Disease-free survival according to CEA levels

Low serum CEA levels (0–2.5 ng/ml) were also associated with higher complete pathologic responses (21 vs. 9%;  $p=0.05$ ) and less recurrences in terms of total recurrences (24% vs. 44%;  $p=0.014$ ) and distant metastasis (15% vs. 31%;  $p=0.034$ ) (Table 4). Multivariate analysis showed a higher risk for relapse (HR=1.66) or death (HR=1.77) with serum CEA levels >2.5 ng/ml (Table 5), although differences were not statistically significant ( $p=0.11$  and  $p=0.19$ , respectively).

#### Discussion

Low serum CEA levels have been historically associated with better prognosis in colorectal cancer [12–16]. Wanebo et al. [17] in 1978 found a correlation between low levels of preoperative serum CEA and estimated mean time to recurrence in patients with Duke's B and C tumors. Since then, several studies have correlated serum CEA levels and outcomes of colorectal cancer. Although rectal and colon cancer share most biological features, local recurrence is much more frequent (as a result of anatomical aspects) and prognostic factors must be evaluated independently. The largest study of serum CEA levels and rectal cancer outcomes was performed by Park et al. [18] with 631 patients, showing that higher levels of CEA were associated with worse 5-year survival rates and higher systemic recurrences. However, in this study, patients managed with neoadjuvant CRT were excluded. As mentioned above, preoperative CRT improves local control and reduces toxicity in patients with stage II and III of the AJCC and is the current standard treatment for these patients.

**Table 4** CEA level, pathologic responses, and recurrences

CEA level	No. of Patients	Complete pathologic responses (%)	<i>p</i>	Total recurrences (local and systemic) (%)	<i>p</i>	Systemic recurrences (%)	<i>p</i>
0–2.5 ng/ml	58	12 (21)	0.05	14 (24)	0.014	9 (15)	0.034
>2.5 ng/ml	90	8 (9)		40 (44)		28 (31)	

CEA carcinoembryonic antigen

Pathologic characteristics of the primary tumor were altered by CRT and several factors have been studied to correlate these changes with better outcomes. Pathologic stage, as defined by ypT and ypN status, is the most important predictor of outcome in operated RC. In our results, there was a significant correlation between ypT and DFS and OS (both  $p < 0.001$ ), ypN ( $p < 0.001$  and  $p = 0.004$  for DFS and OS, respectively) and pathologic stage ( $p < 0.001$  and  $p = 0.002$  for DFS and OS, respectively) (Table 3) as described previously in longer prospective series [19]. Lymphovascular invasion, circumference, distance from anal verge, and hemoglobin levels are examples of clinical and pathological factors, but various studies evaluating tumor response and clinical outcome have shown conflicting results [20].

The response of the primary tumor to neoadjuvant treatment seems to be a good prognostic factor. Two characteristics have been studied: downstaging and TRG. Downstaging (the difference between clinical and pathological T) is an easy way to assess tumor response; however, the accuracy of this technique is limited due to the low precision of the imaging modalities. In two recently published studies of 1,184 and 357 patients, transrectal ultrasound was found to have a staging accuracy of 69% and 77%, respectively [21, 22]. Similarly, the accuracy of MRI staging is reported to range between 59% and 88% [23]. The other way to assess the response of primary tumors is TRG as mentioned

above. In a study, Rodel et al. [4] analyzed 385 patients with rectal cancer after neoadjuvant treatment. They found a statistical improvement in DFS when TRG 2 and 3 were grouped. These differences disappear when TRG was stratified by pathologic stage, raising doubts about the exact significance of this factor. Another study performed by Losi et al. [5] tried to confirm the predictive value of TRG. The small number of patients (106) limited the results, finding statistical significant differences only when TRG 3 and 4 were grouped. However, there was a trend towards improvement in DFS when TRG was stratified by pathologic stage. In our study, DFS and OS were significantly improved with higher TRG. In the stratified analysis by pathologic stage, there was a trend towards improvement in pathologic stage III (3-year DFS for TRG 1, 2, and 3 = 29%, 33%, and 67%, respectively;  $p = 0.136$ ) and statistically significant differences in pathologic stage II (3-year DFS for TRG 1, 2, and 3 = 27%, 64%, and 62%, respectively;  $p = 0.022$ ). Therefore, TRG seems to correlate with DFS as an independent factor, but this has not yet been confirmed in longer-term prospective studies.

For this reason, other molecular and genetic predictors have been evaluated. Ghadimi et al. [24] proposed gene expression profiling for response prediction to neoadjuvant CRT. Their study with 23 patients showed a pattern of 54 genes that could predict response by T downstaging but not

**Table 5** Multivariate analysis

	DFS			OS		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
AJCC TNM pathologic stage						
0	1			1		
I	0.58	0.05–6.8	0.66	0.25	0.01–7.1	0.42
II	1.23	0.11–13.7	0.87	1.3	0.05–30	0.87
III	2.1	0.2–22	0.54	1.73	0.08–39	0.73
TRG						
4	1			1		
3	2.2	0.19–25.4	0.52	3.68	0.15–88	0.42
2	3.76	0.34–41	0.28	2.3	0.09–55	0.61
1	4.61	0.43–49	0.21	9	0.4–206	0.17
CEA level						
0–2.5 ng/ml	1	0.89–3.1	0.11	1	0.76–3.9	0.19
>2.5 ng/ml	1.66			1.73		

AJCC American Joint Committee of Cancer, CEA carcinoembryonic antigen, DFS disease-free survival, OS overall survival, HR hazard ratio, CI confidence interval, TRG tumor regression grade



by TRG, making it difficult to interpret these results. The difficulty in performing genetic analyses in clinical practice has led to the performance of other techniques such as immunohistochemistry (IHQ) and enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) to detect molecular predictors of response. Expression levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) by IHQ have recently been studied by two authors. Both studies correlate high levels of EGFR expression with poor response to CRT assessed by tumor downstaging [25, 26]. Other molecular markers such as p53, p21, Bcl2, Bax, COX2, and vascular endothelial growth factor have been studied in pre-treatment biopsies by IHQ or ELISA, but results are contradictory [27].

The value of serum CEA levels in rectal cancer after the introduction of neoadjuvant CRT has only been assessed in three studies. The first one, by Park et al. [18] with 141 patients, found an association between high serum CEA levels ( $>5$  ng/ml) and poor response to treatment (partial or non-responders). Another study by Yoon et al. [8] also showed that the most important clinical predictor of tumor response was a CEA level  $<5$  ng/ml in univariate and multivariate analyses. However, in the largest study of predictive factors of response to CRT, which included 562 patients, the pre-treatment serum CEA level  $\geq 2.5$  ng/ml was associated with lower complete pathologic responses and downstaging rates. Our results are concordant with these findings; a serum CEA level between 0 and 2.5 ng/ml is associated with higher complete pathologic responses (21% vs. 9%;  $p=0.05$ ), but not with CEA level  $>5$  ng/ml (complete pathologic responses 18% vs. 10%;  $p=0.24$ ). Furthermore, to our knowledge, our study is the first to correlate low serum CEA levels (0–2.5 ng/ml) and better 3-year DFS, since past studies only correlate low serum CEA levels with tumor response. This improvement disappeared when the cut-off point of 5 ng/ml was used, suggesting that lowering this cut-off point to 2.5 ng/ml might be more useful in current clinical practice.

Inherent limitations to our study stem from the retrospective design. An unexpectedly high rate of local relapse was found, which was probably due to suboptimal surgical techniques, although total mesorectal excision was routinely performed. Nevertheless, when excluding local relapses, the value of a low serum CEA level still correlated with fewer systemic relapses (15% vs. 31%;  $p=0.034$ ) (Table 4), suggesting that serum CEA level may reflect aggressive tumor behavior or pre-existing metastatic disease. The study included patients who were treated over 12 years and could not include some variables such as circumferential involvement. During this period, various chemotherapy schedules were employed, but no differences were found between them.

In conclusion, this study is the first to demonstrate a significant correlation between low pre-CRT serum CEA levels (0–2.5 ng/ml) and 3-year DFS with lower recurrence

rates and more complete pathologic responses. These results may be useful in conducting individual risk assessments and designing more aggressive neoadjuvant strategies. However, prospective studies are needed to confirm these results.

## References

1. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R (2004) Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351:1731–1740
2. Bosset JF, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radoscic-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Briffaux A, Collette L (2005) Enhanced tumorocidal effect of chemotherapy with preoperative radiotherapy for rectal cancer: preliminary results—EORTC 22921. *J Clin Oncol* 23:5620–5627
3. Bujko K, Kepka L, Michalski W, Nowacki MP (2006) Does rectal cancer shrinkage induced by preoperative radio(chemo) therapy increase the likelihood of anterior resection? A systematic review of randomised trials. *Radiother Oncol* 80:4–12
4. Rodel C, Martus P, Papadopoulos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R, Wittekind C (2005) Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 23:8688–8696
5. Losi L, Luppi G, Gavioli M, Iachetta F, Bertolini F, D'Amico R, Jovic G, Berton F, Falchi AM, Conte PF (2006) Prognostic value of Dworak grade of regression (GR) in patients with rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 21:645–651
6. Machiels JP, Aydin S, Bonny MA, Hammouch F, Sempoux C (2006) What is the best way to predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy for rectal cancer patients: tumor regression grading, nodal status, or circumferential resection margin invasion? *J Clin Oncol* 24:1319–1
7. Das P, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Feig BW, Chang GJ, Wolff RA, Eng C, Krishnan S, Janjan NA, Crane CH (2007) Predictors of tumor response and downstaging in patients who receive preoperative chemoradiation for rectal cancer. *Cancer* 109:1750–1755
8. Yoon SM, Kim DY, Kim TH, Jung KH, Chang HJ, Koom WS, Lim SB, Choi HS, Jeong SY, Park JG (2007) Clinical parameters predicting pathologic tumor response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69:1167–1172
9. Greene FL, Compton CC, Fritz AG, Shah JP, Winchester DP (2006) *AJCC Cancer Staging Atlas*. Springer, New York (GENERIC) Ref Type: Generic
10. Feliu J, Calvilio J, Escubano A, de Castro J, Sanchez ME, Mata A, Espinosa E, Garcia GA, Mateo A, Gonzalez BM (2002) Neoadjuvant therapy of rectal carcinoma with UFT-leucovorin plus radiotherapy. *Ann Oncol* 13:730–736
11. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A (1997) Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 12:19–23
12. Moertel CG, O'Fallon JR, Go VL, O'Connell MJ, Thynne GS (1986) The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging, and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 58:603–610
13. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM (1997) Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative

- colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg* 185:55–59
14. Carriquiry LA, Pineyro A (1999) Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 42:921–929
  15. Wolmark N, Fisher B, Wieand HS, Henry RS, Lerner H, Legault-Poisson S, Deckers PJ, Dimitrov N, Gordon PH, Jochimsen P (1984) The prognostic significance of preoperative carcinoembryonic antigen levels in colorectal cancer. Results from NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) clinical trials. *Ann Surg* 199:375–382
  16. Sener SF, Imperato JP, Chmiel J, Fremgen A, Sylvester J (1989) The use of cancer registry data to study preoperative carcinoembryonic antigen level as an indicator of survival in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 39:50–57
  17. Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG, Stearns M, Schwartz MK, Oettgen HF (1978) Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N Engl J Med* 299:448–451
  18. Park YA, Lee KY, Kim NK, Baik SH, Sohn SK, Cho CW (2006) Prognostic effect of perioperative change of serum carcinoembryonic antigen level: a useful tool for detection of systemic recurrence in rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 13:645–650
  19. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C (2000) Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124:979–994
  20. Ptak H, Meyer F, Steinert R, Vieth M, Ridwelski K, Lippert H, Gastinger I (2007) No prognostic impact of isolated lymphovascular invasion after radical resection of rectal cancer—results of a multicenter observational study. *Int J Colorectal Dis* 22:749–756
  21. Garcia-Aguilar J, Pollack J, Lee SH, de Hernandez AE, Mellgren A, Wong WD, Finne CO, Rothenberger DA, Madoff RD (2002) Accuracy of endorectal ultrasonography in preoperative staging of rectal tumors. *Dis Colon Rectum* 45:10–15
  22. Manger T, Stroh C (2004) Accuracy of endorectal ultrasonography in the preoperative staging of rectal cancer. *Tech Coloproctol* 8(Suppl 1):s14–s15
  23. Beets-Tan RG, Beets GL (2004) Rectal cancer: review with emphasis on MR imaging. *Radiology* 232:335–346
  24. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Fuzesi L, Langer C, Becker H, Liersch T, Ried T (2005) Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 23:1826–1838
  25. Giralt J, Eraso A, Armengol M, Rossello J, Majo J, Ares C, Espin E, Benavente S, de Torres I (2002) Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54:1460–1465
  26. Kim JS, Kim JM, Li S, Yoon WH, Song KS, Kim KH, Yeo SG, Nam JS, Cho MJ (2006) Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66:195–200
  27. Smith FM, Reynolds JV, Miller N, Stephens RB, Kennedy MJ (2006) Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 32:55–64

## 7.2.Índice de Figuras

Figura 1 Mortalidad por cáncer en España .....	20
Figura 2. Evolución temporal de la mortalidad por cáncer.....	21
Figura 3. Vías de carcinogénesis colo-rectal. ....	25
Figura 4. Distribución en el colon de los fenotipos.....	26
Figura 5. Vía de Señalización WNT/APC.....	26
Figura 6. Vía de señalización de KRAS.....	28
Figura 7. Vía de señalización de PI3K.....	29
Figura 8. Supervivencia libre de enfermedad según el grado de regresión tumoral. (De ref. (145)).....	32
Figura 9. Supervivencia global y recaída local según la distancia al margen de resección circunferencial (CRM). De ref (151).....	33
Figura 10. Supervivencia Libre de Enfermedad en función de la técnica quirúrgica.....	33
Figura 11 Distribución Conceptual de Biomarcadores.....	39
Figura 12 Metabolismo Fluoropirimidinas.....	45
Figura 13 Predictor de Respuesta a la Quimio-radioterapia de 13 genes .....	50
Figura 14 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del predictor de 13-genes.....	50
Figura 15 Pacientes incluidos en el trabajo .....	57
Figura 16 Supervivencia Global (todos los pacientes) .....	68
Figura 17 Supervivencia Libre de Enfermedad (todos los pacientes).....	69
Figura 18 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del género .....	69
Figura 19 Supervivencia Global en función del género .....	69
Figura 20 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del estadio clínico .....	70
Figura 21 Supervivencia Global en función del estadio clínico.....	70
Figura 22 Supervivencia Libre de Enfermedad en función de ypT.....	70
Figura 23 Supervivencia Global en función de ypT.....	70
Figura 24 Supervivencia Libre de Enfermedad en función de ypN.....	71
Figura 25 Supervivencia Global en función de ypN .....	71
Figura 26 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del estadio patológico.....	71
Figura 27 Supervivencia Global en función del estadio patológico .....	71
Figura 28 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del CEA sérico.....	72
Figura 29 Supervivencia Global en función del CEA sérico .....	72
Figura 30 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del TRG.....	72
Figura 31 Supervivencia Global en función del TRG .....	72
Figura 32 Cambios de Expresión Génica tras el tratamiento Quimio-Radioterápico .....	75
Figura 33 Supervivencia Libre de Enfermedad en función del cambio de expresión de TFF3 .....	77
Figura 34 Supervivencia Global en función del cambio de expresión de TFF3.....	78
Figura 35 Tinción Inmunohistoquímica de TFF3 .....	79
Figura 36 Supervivencia Libre de Enfermedad según expresión de TFF3 por inmunohistoquímica .....	80
Figura 37 Supervivencia Global según expresión de TFF3 por inmunohistoquímica .....	81
Figura 38 Western-Blot de líneas de CCR humano. Control de TFF3.....	83

Figura 39 Cambios en la expresión de RNA de TFF3 por 5FU en líneas celulares de CCR humano .....	83
Figura 40 Western-Blot de líneas de CCR humano. 24 horas tras la adición de 5FU (60 µg) .....	83
Figura 41 Western-Blot de líneas de CCR humano. 48 horas tras la adición de 5FU (60 µg) .....	84
Figura 42 Western-Blot tras 24 de transfección con vector pCMV6-TFF3 .....	84
Figura 43. A: expresión de TFF3 en células transfectadas con pCMV6-TFF3 y con vector vacío.....	84
Figura 44 Genes diferenciados estadísticamente sobre-expresados (rojo) o infraexpresados (verde) (p<0.01) en células que expresan TFF3 .....	85
Figura 45 Desarrollo del Proyecto de Investigación .....	91
Figura 46 Interacción Funcional entre NFκB y STAT3 en células del sistema inmune y su repercusión en la célula tumoral (tomado de Ref (355)) .....	98
Figura 47 Red de Señalización 1.....	104
Figura 48 Red de Señalización 2.....	104
Figura 49 Estructura de TFF3 .....	105
Figura 50 Señalización de TFF3 .....	107
Figura 51 Restitución Mucosa Mediada por TFF3.....	109
Figura 52 Relación de Survivin con la muerte celular.....	111
Figura 53 Diseño del Estudio Fase II con rhITF.....	113

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>. 2012.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. World Health Organization. 2012.
3. <http://costprojections.cancer.gov/>. 2012.
4. <http://datos.bancomundial.org/indicador/GB.XPD.RSDV.GD.ZS/countries/1W-ES?display=graph>. 2012.
5. Casado E, Garcia VM, Sanchez JJ, Blanco M, Maurel J, Feliu J, et al. A combined strategy of SAGE and quantitative PCR Provides a 13-gene signature that predicts preoperative chemoradiotherapy response and outcome in rectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 15;17(12):4145-54.
6. Murphy TK, Calle EE, Rodriguez C, Kahn HS, Thun MJ. Body mass index and colon cancer mortality in a large prospective study. *Am J Epidemiol*. 2000 Nov 1;152(9):847-54.
7. Caan BJ, Coates AO, Slattery ML, Potter JD, Quesenberry CP, Jr., Edwards SM. Body size and the risk of colon cancer in a large case-control study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998 Feb;22(2):178-84.
8. Shike M. Body weight and colon cancer. *Am J Clin Nutr*. 1996 Mar;63(3 Suppl):442S-4S.
9. Moore LL, Bradlee ML, Singer MR, Splansky GL, Proctor MH, Ellison RC, et al. BMI and waist circumference as predictors of lifetime colon cancer risk in Framingham Study adults. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 Apr;28(4):559-67.
10. Terry PD, Miller AB, Rohan TE. Obesity and colorectal cancer risk in women. *Gut*. 2002 Aug;51(2):191-4.
11. Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW, Jr. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Apr 5;87(7):517-23.
12. Kampman E, Potter JD, Slattery ML, Caan BJ, Edwards S. Hormone replacement therapy, reproductive history, and colon cancer: a multicenter, case-control study in the United States. *Cancer Causes Control*. 1997 Mar;8(2):146-58.
13. Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, Hubbell FA, Ascensao J, Rodabough RJ, et al. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 2004 Mar 4;350(10):991-1004.
14. Slattery ML, Potter J, Caan B, Edwards S, Coates A, Ma KN, et al. Energy balance and colon cancer--beyond physical activity. *Cancer Res*. 1997 Jan 1;57(1):75-80.
15. Willett WC. Diet and cancer. *Oncologist*. 2000;5(5):393-404.
16. Kono S. Secular trend of colon cancer incidence and mortality in relation to fat and meat intake in Japan. *Eur J Cancer Prev*. 2004 Apr;13(2):127-32.
17. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 2005 Jan 12;293(2):172-82.
18. Sanjoaquin MA, Allen N, Couto E, Roddam AW, Key TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Int J Cancer*. 2005 Feb 20;113(5):825-8.
19. Martinez ME, Giovannucci E, Jiang R, Henning SM, Jacobs ET, Thompson P, et al. Folate fortification, plasma folate, homocysteine and colorectal adenoma recurrence. *Int J Cancer*. 2006 Sep 15;119(6):1440-6.
20. Wickramasinghe SN, Fida S. Bone marrow cells from vitamin B12- and folate-deficient patients misincorporate uracil into DNA. *Blood*. 1994 Mar 15;83(6):1656-61.
21. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1996 Nov 1;56(21):4862-4.
22. Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifried A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal cancer risk (United States). *Cancer Causes Control*. 2002 Apr;13(3):239-48.
23. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Sep;8(9):825-9.
24. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Jun;8(6):513-8.
25. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, et al. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Aug;8(8):659-68.

26. Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Calcium and vitamin D. Their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;889:107-19.
27. Peters U, McGlynn KA, Chatterjee N, Gunter E, Garcia-Closas M, Rothman N, et al. Vitamin D, calcium, and vitamin D receptor polymorphism in colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Dec;10(12):1267-74.
28. Tangrea J, Helzlsouer K, Pietinen P, Taylor P, Hollis B, Virtamo J, et al. Serum levels of vitamin D metabolites and the subsequent risk of colon and rectal cancer in Finnish men. *Cancer Causes Control.* 1997 Jul;8(4):615-25.
29. Duffield-Lillico AJ, Reid ME, Turnbull BW, Combs GF, Jr., Slate EH, Fischbach LA, et al. Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Jul;11(7):630-9.
30. Baron JA, Beach M, Mandel JS, van Stolk RU, Haile RW, Sandler RS, et al. Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):101-7.
31. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med.* 1995 Sep 7;333(10):609-14.
32. Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res.* 1988 Aug 1;48(15):4399-404.
33. Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro S. A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1991 Mar 6;83(5):355-8.
34. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW, Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med.* 1991 Dec 5;325(23):1593-6.
35. Moorghen M, Ince P, Finney KJ, Sunter JP, Appleton DR, Watson AJ. A protective effect of sulindac against chemically-induced primary colonic tumours in mice. *J Pathol.* 1988 Dec;156(4):341-7.
36. Narisawa T, Sato M, Tani M, Kudo T, Takahashi T, Goto A. Inhibition of development of methylnitrosourea-induced rat colon tumors by indomethacin treatment. *Cancer Res.* 1981 May;41(5):1954-7.
37. Pollard M, Luckert PH. Effect of piroxicam on primary intestinal tumors induced in rats by N-methylnitrosourea. *Cancer Lett.* 1984 Dec;25(2):117-21.
38. Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. *Cancer Res.* 1987 Oct 15;47(20):5340-6.
39. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hyland LM, Celano P, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.* 1993 May 6;328(18):1313-6.
40. Labayle D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, et al. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* 1991 Sep;101(3):635-9.
41. Rigau J, Pique JM, Rubio E, Planas R, Tarrech JM, Bordas JM. Effects of long-term sulindac therapy on colonic polyposis. *Ann Intern Med.* 1991 Dec 15;115(12):952-4.
42. Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med.* 2003 Mar 6;348(10):891-9.
43. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2044-58.
44. Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM, Tayob N, Kastrinos F, Sparr J, et al. Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology.* 2009 Nov;137(5):1621-7.
45. Cleary SP, Cotterchio M, Jenkins MA, Kim H, Bristow R, Green R, et al. Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study. *Gastroenterology.* 2009 Apr;136(4):1251-60.
46. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* 2007 Oct 15;21(20):2525-38.
47. Burt RW, Leppert MF, Slattery ML, Samowitz WS, Spirio LN, Kerber RA, et al. Genetic testing and phenotype in a large kindred with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* 2004 Aug;127(2):444-51.
48. Schreiberman IR, Baker M, Amos C, McGarrity TJ. The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. *Am J Gastroenterol.* 2005 Feb;100(2):476-90.
49. Pilarski R. Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature. *J Genet Couns.* 2009 Feb;18(1):13-27.

50. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA*. 2005 Apr 27;293(16):1979-85.
51. Houlston RS, Tomlinson IP. Polymorphisms and colorectal tumor risk. *Gastroenterology*. 2001 Aug;121(2):282-301.
52. Greene FL, Page D, ID F. *AJCC Staging Handbook: 7th Edition*. New York: Springer. 2010.
53. Kim KH, Yang SS, Yoon YS, Lim SB, Yu CS, Kim JC. Validation of the seventh edition of the American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis (AJCC TNM) staging in patients with stage II and stage III colorectal carcinoma: analysis of 2511 cases from a medical centre in Korea. *Colorectal Dis*. 2011 Aug;13(8):e220-6.
54. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
55. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007 Nov 16;318(5853):1108-13.
56. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*. 1987 Oct 30;37(2):147-51.
57. Tudek B, Bird RP, Bruce WR. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res*. 1989 Mar 1;49(5):1236-40.
58. Siu IM, Robinson DR, Schwartz S, Kung HJ, Pretlow TG, Petersen RB, et al. The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. *Cancer Res*. 1999 Jan 1;59(1):63-6.
59. Heinen CD, Shivapurkar N, Tang Z, Groden J, Alabaster O. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res*. 1996 Dec 1;56(23):5339-41.
60. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001 Oct;1(1):55-67.
61. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, et al. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):300-3.
62. Rotman G, Shiloh Y. ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet*. 1998;7(10):1555-63.
63. Smith L, Liu SJ, Goodrich L, Jacobson D, Degen C, Bentley N, et al. Duplication of ATR inhibits MyoD, induces aneuploidy and eliminates radiation-induced G1 arrest. *Nat Genet*. 1998 May;19(1):39-46.
64. Zhang H, Tomblin G, Weber BL. BRCA1, BRCA2, and DNA damage response: collision or collusion? *Cell*. 1998 Feb 20;92(4):433-6.
65. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2073-87 e3.
66. Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS, Paik S, Kirsch IR, Wolmark N, et al. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol*. 2007 Mar 1;25(7):767-72.
67. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, Morere JF, Uzzan B. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009 Jul;45(10):1890-6.
68. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 10;27(11):1814-21.
69. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8698-702.
70. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997 Mar 1;57(5):808-11.
71. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*. 1995 Oct 15;55(20):4525-30.
72. Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res*. 1999 May 15;59(10):2307-12.
73. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8681-6.

74. Sandhu S, Wu X, Nabi Z, Rastegar M, Kung S, Mai S, et al. Loss of HLTF function promotes intestinal carcinogenesis. *Mol Cancer*. 2012;11:18.
75. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997 Apr 24;386(6627):761, 3.
76. Slattery ML, Curtin K, Wolff RK, Boucher KM, Sweeney C, Edwards S, et al. A comparison of colon and rectal somatic DNA alterations. *Dis Colon Rectum*. 2009 Jul;52(7):1304-11.
77. Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, Perucho M. Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell*. 2003 Aug;4(2):121-31.
78. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2002 May;38(7):867-71.
79. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*. 1993 Dec 10;262(5140):1734-7.
80. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, et al. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science*. 1993 Dec 10;262(5140):1731-4.
81. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*. 1998 Apr 24;280(5363):596-9.
82. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, et al. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):1982-7.
83. Sakamoto Y, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. Methylation of CpG loci in 5'-flanking region alters steady-state expression of adenomatous polyposis coli gene in colon cancer cell lines. *J Cell Biochem*. 2001;80(3):415-23.
84. Spirio LN, Samowitz W, Robertson J, Robertson M, Burt RW, Leppert M, et al. Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. *Nat Genet*. 1998 Dec;20(4):385-8.
85. Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2000 Sep;119(3):854-65.
86. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, et al. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*. 1999 May 6;18(18):2883-91.
87. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009 Jun;28(1-2):151-66.
88. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, Polakis P. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res*. 1997 Oct 15;57(20):4624-30.
89. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5522-7.
90. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998 Sep 4;281(5382):1509-12.
91. Kawanishi J, Kato J, Sasaki K, Fujii S, Watanabe N, Niitsu Y. Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion due to mutation of the beta-catenin gene in a human cancer cell line, HSC-39. *Mol Cell Biol*. 1995 Mar;15(3):1175-81.
92. Lubber B, Candidus S, Handschuh G, Mentele E, Hutzler P, Feller S, et al. Tumor-derived mutated E-cadherin influences beta-catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. *Cell Adhes Commun*. 2000 May;7(5):391-408.
93. Duursma AM, Agami R. Ras interference as cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2003 Aug;13(4):267-73.
94. Fransen K, Klintenas M, Osterstrom A, Dimberg J, Monstein HJ, Soderkvist P. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*. 2004 Apr;25(4):527-33.
95. Wong R, Cunningham D. Using predictive biomarkers to select patients with advanced colorectal cancer for treatment with epidermal growth factor receptor antibodies. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5668-70.
96. Cejas P, Lopez-Gomez M, Aguayo C, Madero R, de Castro Carpeno J, Belda-Iniesta C, et al. KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis. *PLoS One*. 2009;4(12):e8199.
97. Lubomierski N, Plotz G, Wormek M, Engels K, Kriener S, Trojan J, et al. BRAF mutations in colorectal carcinoma suggest two entities of microsatellite-unstable tumors. *Cancer*. 2005 Sep 1;104(5):952-61.
98. Ikenoue T, Hikiba Y, Kanai F, Aragaki J, Tanaka Y, Imamura J, et al. Different effects of point mutations within the B-Raf glycine-rich loop in colorectal tumors on mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated



kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor kappaB pathway and cellular transformation. *Cancer Res.* 2004 May 15;64(10):3428-35.

99. Joyce T, Oikonomou E, Kosmidou V, Makrodouli E, Bantounas I, Avlonitis S, et al. A molecular signature for oncogenic BRAF in human colon cancer cells is revealed by microarray analysis. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012 Apr 19.

100. Yokota T, Ura T, Shibata N, Takahari D, Shitara K, Nomura M, et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2011 Mar 1;104(5):856-62.

101. Somasundaram K. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci.* 2000 Apr 1;5:D424-37.

102. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 1990 Dec 1;50(23):7717-22.

103. Ohue M, Tomita N, Monden T, Fujita M, Fukunaga M, Takami K, et al. A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res.* 1994 Sep 1;54(17):4798-804.

104. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993 Nov 19;75(4):817-25.

105. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 1994 Mar 1;54(5):1169-74.

106. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jul;2(7):489-501.

107. Foster FM, Traer CJ, Abraham SM, Fry MJ. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci.* 2003 Aug 1;116(Pt 15):3037-40.

108. van der Heijden MS, Bernards R. Inhibition of the PI3K pathway: hope we can believe in? *Clin Cancer Res.* 2010 Jun 15;16(12):3094-9.

109. Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, Obata T, Tanaka Y, Imamura J, et al. Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 2005 Jun 1;65(11):4562-7.

110. Naguib A, Cooke JC, Happerfield L, Kerr L, Gay LJ, Luben RN, et al. Alterations in PTEN and PIK3CA in colorectal cancers in the EPIC Norfolk study: associations with clinicopathological and dietary factors. *BMC Cancer.* 2011;11:123.

111. Huang F, Chen YG. Regulation of TGF-beta receptor activity. *Cell Biosci.* 2012;2:9.

112. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, et al. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 1999 Jan 15;59(2):320-4.

113. Ewen ME, Sluss HK, Whitehouse LL, Livingston DM. TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell.* 1993 Sep 24;74(6):1009-20.

114. Alexandrow MG, Moses HL. Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. *Cancer Res.* 1995 Apr 1;55(7):1452-7.

115. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 1994 Sep 15;371(6494):257-61.

116. Grady WM, Willis JE, Trobridge P, Romero-Gallo J, Munoz N, Olechnowicz J, et al. Proliferation and Cdk4 expression in microsatellite unstable colon cancers with TGFBR2 mutations. *Int J Cancer.* 2006 Feb 1;118(3):600-8.

117. Geng Y, Weinberg RA. Transforming growth factor beta effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Nov 1;90(21):10315-9.

118. Howe PH, Draetta G, Leof EB. Transforming growth factor beta 1 inhibition of p34cdc2 phosphorylation and histone H1 kinase activity is associated with G1/S-phase growth arrest. *Mol Cell Biol.* 1991 Mar;11(3):1185-94.

119. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995 Dec 1;55(23):5548-50.

120. Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, Hedrick L, Cho KR, Orth K, et al. A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1995 Dec 1;55(23):5545-7.

121. Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, Weinstein CL, Kern SE, Hamilton SR, et al. Mad-related genes in the human. *Nat Genet.* 1996 Jul;13(3):347-9.

122. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell.* 1998 Mar 6;92(5):645-56.

123. Calva D, Dahdaleh FS, Woodfield G, Weigel RJ, Carr JC, Chinnathambi S, et al. Discovery of SMAD4 promoters, transcription factor binding sites and deletions in juvenile polyposis patients. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(13):5369-78.
124. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science.* 1998 May 15;280(5366):1086-8.
125. Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, et al. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell.* 1996 Aug 23;86(4):543-52.
126. Kauer WK, Prantl L, Dittler HJ, Siewert JR. The value of endosonographic rectal carcinoma staging in routine diagnostics: a 10-year analysis. *Surg Endosc.* 2004 Jul;18(7):1075-8.
127. Knaebel HP, Koch M, Feise T, Benner A, Kienle P. Diagnostics of rectal cancer: endorectal ultrasound. *Recent Results Cancer Res.* 2005;165:46-57.
128. Ptok H, Marusch F, Meyer F, Wendling P, Wenisch HJ, Sendt W, et al. Feasibility and accuracy of TRUS in the pre-treatment staging for rectal carcinoma in general practice. *Eur J Surg Oncol.* 2006 May;32(4):420-5.
129. Puli SR, Bechtold ML, Reddy JB, Choudhary A, Antillon MR, Brugge WR. How good is endoscopic ultrasound in differentiating various T stages of rectal cancer? Meta-analysis and systematic review. *Ann Surg Oncol.* 2009 Feb;16(2):254-65.
130. Katsura Y, Yamada K, Ishizawa T, Yoshinaka H, Shimazu H. Endorectal ultrasonography for the assessment of wall invasion and lymph node metastasis in rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1992 Apr;35(4):362-8.
131. Kim JC, Kim HC, Yu CS, Han KR, Kim JR, Lee KH, et al. Efficacy of 3-dimensional endorectal ultrasonography compared with conventional ultrasonography and computed tomography in preoperative rectal cancer staging. *Am J Surg.* 2006 Jul;192(1):89-97.
132. Akasu T, Sugihara K, Moriya Y, Fujita S. Limitations and pitfalls of transrectal ultrasonography for staging of rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1997 Oct;40(10 Suppl):S10-5.
133. Bhutani MS. Recent developments in the role of endoscopic ultrasonography in diseases of the colon and rectum. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007 Jan;23(1):67-73.
134. Siddiqui AA, Fayiga Y, Huerta S. The role of endoscopic ultrasound in the evaluation of rectal cancer. *Int Semin Surg Oncol.* 2006;3:36.
135. Garcia-Aguilar J, Pollack J, Lee SH, Hernandez de Anda E, Mellgren A, Wong WD, et al. Accuracy of endorectal ultrasonography in preoperative staging of rectal tumors. *Dis Colon Rectum.* 2002 Jan;45(1):10-5.
136. Puli SR, Reddy JB, Bechtold ML, Choudhary A, Antillon MR, Brugge WR. Accuracy of endoscopic ultrasound to diagnose nodal invasion by rectal cancers: a meta-analysis and systematic review. *Ann Surg Oncol.* 2009 May;16(5):1255-65.
137. Al-Sukhni E, Milot L, Fruitman M, Beyene J, Victor JC, Schmock S, et al. Diagnostic Accuracy of MRI for Assessment of T Category, Lymph Node Metastases, and Circumferential Resection Margin Involvement in Patients with Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2012 Jan 20.
138. Patel UB, Brown G, Rutten H, West N, Sebag-Montefiore D, Glynne-Jones R, et al. Comparison of Magnetic Resonance Imaging and Histopathological Response to Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012 Apr 24.
139. Patel UB, Taylor F, Blomqvist L, George C, Evans H, Tekkis P, et al. Magnetic resonance imaging-detected tumor response for locally advanced rectal cancer predicts survival outcomes: MERCURY experience. *J Clin Oncol.* 2011 Oct 1;29(28):3753-60.
140. Bipat S, Glas AS, Slors FJ, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Stoker J. Rectal cancer: local staging and assessment of lymph node involvement with endoluminal US, CT, and MR imaging--a meta-analysis. *Radiology.* 2004 Sep;232(3):773-83.
141. Tsunoda Y, Ito M, Fujii H, Kuwano H, Saito N. Preoperative diagnosis of lymph node metastases of colorectal cancer by FDG-PET/CT. *Jpn J Clin Oncol.* 2008 May;38(5):347-53.
142. Tateishi U, Maeda T, Morimoto T, Miyake M, Arai Y, Kim EE. Non-enhanced CT versus contrast-enhanced CT in integrated PET/CT studies for nodal staging of rectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007 Oct;34(10):1627-34.
143. Brush J, Boyd K, Chappell F, Crawford F, Dozier M, Fenwick E, et al. The value of FDG positron emission tomography/computerised tomography (PET/CT) in pre-operative staging of colorectal cancer: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2011 Sep;15(35):1-192, iii-iv.

144. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis.* 1997;12(1):19-23.
145. Rodel C, Martus P, Papadoupoulos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 1;23(34):8688-96.
146. Horn A, Morild I, Dahl O. Tumour shrinkage and down staging after preoperative radiation of rectal adenocarcinomas. *Radiother Oncol.* 1990 May;18(1):19-28.
147. Valentini V, Coco C, Picciocchi A, Morganti AG, Trodella L, Ciabattini A, et al. Does downstaging predict improved outcome after preoperative chemoradiation for extraperitoneal locally advanced rectal cancer? A long-term analysis of 165 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002 Jul 1;53(3):664-74.
148. Rullier A, Gourgou-Bourgade S, Jarlier M, Bibeau F, Chassagne-Clement C, Hennequin C, et al. Predictive factors of positive circumferential resection margin after radiochemotherapy for rectal cancer: The French randomised trial ACCORD12/0405 PRODIGE 2. *Eur J Cancer.* 2012 Aug 18.
149. White R, Ung KA, Mathlum M. Accuracy of magnetic resonance imaging in the pre-operative staging of rectal adenocarcinoma: Experience from a regional Australian cancer center. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2012 Nov 26.
150. Nagtegaal ID, van de Velde CJ, van der Worp E, Kapiteijn E, Quirke P, van Krieken JH. Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimen: clinical significance of the pathologist in quality control. *J Clin Oncol.* 2002 Apr 1;20(7):1729-34.
151. Bernstein TE, Endreseth BH, Romundstad P, Wibe A. Circumferential resection margin as a prognostic factor in rectal cancer. *Br J Surg.* 2009 Nov;96(11):1348-57.
152. Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol.* 2008 Jan 10;26(2):303-12.
153. Aitken RJ. Mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg.* 1996 Feb;83(2):214-6.
154. Enker WE, Thaler HT, Cranor ML, Polyak T. Total mesorectal excision in the operative treatment of carcinoma of the rectum. *J Am Coll Surg.* 1995 Oct;181(4):335-46.
155. Heald RJ. A new approach to rectal cancer. *Br J Hosp Med.* 1979 Sep;22(3):277-81.
156. MacFarlane JK, Ryall RD, Heald RJ. Mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet.* 1993 Feb 20;341(8843):457-60.
157. Martling A, Cedermark B, Johansson H, Rutqvist LE, Holm T. The surgeon as a prognostic factor after the introduction of total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer. *Br J Surg.* 2002 Aug;89(8):1008-13.
158. Martling AL, Holm T, Rutqvist LE, Moran BJ, Heald RJ, Cedemark B. Effect of a surgical training programme on outcome of rectal cancer in the County of Stockholm. Stockholm Colorectal Cancer Study Group, Basingstoke Bowel Cancer Research Project. *Lancet.* 2000 Jul 8;356(9224):93-6.
159. West NP, Finan PJ, Anderin C, Lindholm J, Holm T, Quirke P. Evidence of the oncologic superiority of cylindrical abdominoperineal excision for low rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 20;26(21):3517-22.
160. Gunderson LL, Sargent DJ, Tepper JE, Wolmark N, O'Connell MJ, Begovic M, et al. Impact of T and N stage and treatment on survival and relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis. *J Clin Oncol.* 2004 May 15;22(10):1785-96.
161. Jessup JM, Stewart AK, Menck HR. The National Cancer Data Base report on patterns of care for adenocarcinoma of the rectum, 1985-95. *Cancer.* 1998 Dec 1;83(11):2408-18.
162. Brodsky JT, Richard GK, Cohen AM, Minsky BD. Variables correlated with the risk of lymph node metastasis in early rectal cancer. *Cancer.* 1992 Jan 15;69(2):322-6.
163. Zenni GC, Abraham K, Harford FJ, Potocki DM, Herman C, Dobrin PB. Characteristics of rectal carcinomas that predict the presence of lymph node metastases: implications for patient selection for local therapy. *J Surg Oncol.* 1998 Feb;67(2):99-103.
164. Mellgren A, Sirivongs P, Rothenberger DA, Madoff RD, Garcia-Aguilar J. Is local excision adequate therapy for early rectal cancer? *Dis Colon Rectum.* 2000 Aug;43(8):1064-71; discussion 71-4.
165. Blumberg D, Paty PB, Guillem JG, Picon AI, Minsky BD, Wong WD, et al. All patients with small intramural rectal cancers are at risk for lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum.* 1999 Jul;42(7):881-5.
166. Nastro P, Beral D, Hartley J, Monson JR. Local excision of rectal cancer: review of literature. *Dig Surg.* 2005;22(1-2):6-15.
167. Zlobec I, Minoo P, Karamitopoulou E, Peros G, Patsouris ES, Lehmann F, et al. Role of tumor size in the pre-operative management of rectal cancer patients. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:61.
168. Nascimbeni R, Burgart LJ, Nivatvongs S, Larson DR. Risk of lymph node metastasis in T1 carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum.* 2002 Feb;45(2):200-6.

169. Wu ZY, Zhao G, Chen Z, Du JL, Wan J, Lin F, et al. Oncological outcomes of transanal local excision for high risk T(1) rectal cancers. *World J Gastrointest Oncol*. 2012 Apr 15;4(4):84-8.
170. Borschitz T, Heintz A, Junginger T. Transanal endoscopic microsurgical excision of pT2 rectal cancer: results and possible indications. *Dis Colon Rectum*. 2007 Mar;50(3):292-301.
171. Sengupta S, Tjandra JJ. Local excision of rectal cancer: what is the evidence? *Dis Colon Rectum*. 2001 Sep;44(9):1345-61.
172. Bentrem DJ, Okabe S, Wong WD, Guillem JG, Weiser MR, Temple LK, et al. T1 adenocarcinoma of the rectum: transanal excision or radical surgery? *Ann Surg*. 2005 Oct;242(4):472-7; discussion 7-9.
173. Ohtani H, Tamamori Y, Azuma T, Mori Y, Nishiguchi Y, Maeda K, et al. A meta-analysis of the short- and long-term results of randomized controlled trials that compared laparoscopy-assisted and conventional open surgery for rectal cancer. *J Gastrointest Surg*. 2011 Aug;15(8):1375-85.
174. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 Mar 14;324(11):709-15.
175. Boulis-Wassif S, Gerard A, Loygue J, Camelot D, Buyse M, Duez N. Final results of a randomized trial on the treatment of rectal cancer with preoperative radiotherapy alone or in combination with 5-fluorouracil, followed by radical surgery. Trial of the European Organization on Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group. *Cancer*. 1984 May 1;53(9):1811-8.
176. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med*. 2006 Sep 14;355(11):1114-23.
177. Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouche O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 1;24(28):4620-5.
178. Ceelen W, Fierens K, Van Nieuwenhove Y, Pattyn P. Preoperative chemoradiation versus radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009 Jun 15;124(12):2966-72.
179. Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, Yothers G, Deutsch M, Allegra CJ, et al. Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 1;27(31):5124-30.
180. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 21;351(17):1731-40.
181. Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, et al. Preoperative Versus Postoperative Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-94 Randomized Phase III Trial After a Median Follow-Up of 11 Years. *J Clin Oncol*. 2012 Apr 23.
182. Park JH, Yoon SM, Yu CS, Kim JH, Kim TW, Kim JC. Randomized phase 3 trial comparing preoperative and postoperative chemoradiotherapy with capecitabine for locally advanced rectal cancer. *Cancer*. 2011 Aug 15;117(16):3703-12.
183. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmeier A, Michalski W, Bebenek M, Kryj M. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *Br J Surg*. 2006 Oct;93(10):1215-23.
184. Ngan S, Fisher R, Goldstein D, Solomon M, Burmeister B, Ackland SP, et al. A randomized trial comparing local recurrence (LR) rates between short-course (SC) and long-course (LC) preoperative radiotherapy (RT) for clinical T3 rectal cancer: An intergroup trial (TROC, AGITG, CSSANZ, RACS). *ASCO Meeting Abstracts*. 2010 June 14, 2010;28(15\_suppl):3509.
185. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, Solomon M, Goldstein D, Joseph D, et al. Randomized trial of short-course radiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with t3 rectal cancer: trans-tasman radiation oncology group trial 01.04. *J Clin Oncol*. 2012 Nov 1;30(31):3827-33.
186. van Dijk TH, Havenga K, Beukema J, Beets GL, Gelderblom H, de Jong KP, et al. Short-course radiation therapy, neoadjuvant bevacizumab, capecitabine and oxaliplatin, and radical resection of primary tumor and metastases in primary stage IV rectal cancer: A phase II multicenter study of the Dutch Colorectal Cancer Group. *ASCO Meeting Abstracts*. 2010 June 14, 2010;28(15\_suppl):3638.
187. Aschele C, Pinto C, Cordio S, Rosati G, Tagliagambe A, Artale S, et al. Preoperative fluorouracil (FU)-based chemoradiation with and without weekly oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: Pathologic response analysis of the Studio Terapia Adiuvante Retto (STAR)-01 randomized phase III trial. *ASCO Meeting Abstracts*. 2009 June 18, 2009;27(18S):CRA4008.

188. Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, Martel-Laffay I, Hennequin C, Etienne PL, et al. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1638-44.
189. Roh MS, Yothers GA, O'Connell MJ, Beart RW, Pitot HC, Shields AF, et al. The impact of capecitabine and oxaliplatin in the preoperative multimodality treatment in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-04. *ASCO Meeting Abstracts*. 2011 June 9, 2011;29(15\_suppl):3503.
190. Hofheinz RD, Wenz F, Post S, Matzdorff A, Laechelt S, Hartmann JT, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012 Apr 12.
191. Beets GL, Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, Crane CH, Capirci C, et al. Evaluation of response after chemoradiation for rectal cancer as a predictive factor for the benefit of adjuvant chemotherapy: A pooled analysis of 2,724 individual patients. *ASCO Meeting Abstracts*. 2011 February 3, 2011;29(4\_suppl):361.
192. Petersen SH, Harling H, Kirkeby LT, Wille-Jorgensen P, Mocellin S. Postoperative adjuvant chemotherapy in rectal cancer operated for cure. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;3:CD004078.
193. Chau I, Brown G, Cunningham D, Tait D, Wotherspoon A, Norman AR, et al. Neoadjuvant capecitabine and oxaliplatin followed by synchronous chemoradiation and total mesorectal excision in magnetic resonance imaging-defined poor-risk rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 1;24(4):668-74.
194. Fernandez-Martos C, Pericay C, Aparicio J, Salud A, Safont M, Massuti B, et al. Phase II, randomized study of concomitant chemoradiotherapy followed by surgery and adjuvant capecitabine plus oxaliplatin (CAPOX) compared with induction CAPOX followed by concomitant chemoradiotherapy and surgery in magnetic resonance imaging-defined, locally advanced rectal cancer: Grupo cancer de recto 3 study. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 10;28(5):859-65.
195. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA*. 2012 Apr 4;307(13):1383-93.
196. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 1;29(1):11-6.
197. Dewdney A, Cunningham D, Tabernero J, Capdevila J, Glimelius B, Cervantes A, et al. Multicenter Randomized Phase II Clinical Trial Comparing Neoadjuvant Oxaliplatin, Capecitabine, and Preoperative Radiotherapy With or Without Cetuximab Followed by Total Mesorectal Excision in Patients With High-Risk Rectal Cancer (EXPERT-C). *J Clin Oncol*. 2012 May 10;30(14):1620-7.
198. Willett CG, Duda DG, di Tomaso E, Boucher Y, Ancukiewicz M, Sahani DV, et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 20;27(18):3020-6.
199. Crane CH, Eng C, Feig BW, Das P, Skibber JM, Chang GJ, et al. Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab, capecitabine, and radiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Mar 1;76(3):824-30.
200. Spigel DR, Bendell JC, McCleod M, Shipley DL, Arrowsmith E, Barnes EK, et al. Phase II study of bevacizumab and chemoradiation in the preoperative or adjuvant treatment of patients with stage II/III rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2012 Mar;11(1):45-52.
201. Nogue M, Salud A, Vicente P, Arrivi A, Roca JM, Losa F, et al. Addition of bevacizumab to XELOX induction therapy plus concomitant capecitabine-based chemoradiotherapy in magnetic resonance imaging-defined poor-prognosis locally advanced rectal cancer: the AVACROSS study. *Oncologist*. 2011;16(5):614-20.
202. Machiels JP, Sempoux C, Scalliet P, Coche JC, Humblet Y, Van Cutsem E, et al. Phase I/II study of preoperative cetuximab, capecitabine, and external beam radiotherapy in patients with rectal cancer. *Ann Oncol*. 2007 Apr;18(4):738-44.
203. Eisterer WM, De Vries A, Oefner D, Greil R, Rabl H, Tschmelitsch J, et al. Neoadjuvant chemoradiation therapy with capecitabine (X) plus cetuximab (C), and external beam radiotherapy (RT) in locally advanced rectal cancer (LARC): ABCSG trial R03. *ASCO Meeting Abstracts*. 2009 June 8, 2009;27(15S):4109.
204. Velenik V, Ocvrk J, Oblak I, Anderluh F. A phase II study of cetuximab, capecitabine and radiotherapy in neoadjuvant treatment of patients with locally advanced resectable rectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2010 Mar;36(3):244-50.

205. Chung KY, Minsky B, Schrag D, O'Reilly E, D'Adamo D, Hollywood E, et al. Phase I trial of preoperative cetuximab with concurrent continuous infusion 5-fluorouracil and pelvic radiation in patients with local-regionally advanced rectal cancer. *ASCO Meeting Abstracts*. 2006 June 16, 2006;24(18\_suppl):3560.
206. Bertolini F, Chiara S, Bengala C, Antognoni P, Dealis C, Zironi S, et al. Neoadjuvant treatment with single-agent cetuximab followed by 5-FU, cetuximab, and pelvic radiotherapy: a phase II study in locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Feb 1;73(2):466-72.
207. Hofheinz RD, Horisberger K, Woernle C, Wenz F, Kraus-Tiefenbacher U, Kahler G, et al. Phase I trial of cetuximab in combination with capecitabine, weekly irinotecan, and radiotherapy as neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Dec 1;66(5):1384-90.
208. Horisberger K, Treschl A, Mai S, Barreto-Miranda M, Kienle P, Strobel P, et al. Cetuximab in combination with capecitabine, irinotecan, and radiotherapy for patients with locally advanced rectal cancer: results of a Phase II MARGIT trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Aug 1;74(5):1487-93.
209. Hong YS, Kim DY, Lee KS, Lim SB, Choi HS, Jeong SY, et al. Phase II study of preoperative chemoradiation (CRT) with cetuximab, irinotecan and capecitabine in patients with locally advanced resectable rectal cancer. *ASCO Meeting Abstracts*. 2007 June 21, 2007;25(18\_suppl):4045.
210. Cabebe EC, Kuo T, Koong A, Welton M, Shelton A, Kunz PL, et al. Phase I trial of preoperative cetuximab in combination with oxaliplatin, capecitabine, and radiation therapy for locally advanced rectal cancer. *ASCO Meeting Abstracts*. 2008 August 18, 2008;26(15\_suppl):15019.
211. Rodel C, Arnold D, Hipp M, Liersch T, Dellas K, Ilesalniks I, et al. Phase I-II trial of cetuximab, capecitabine, oxaliplatin, and radiotherapy as preoperative treatment in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008 Mar 15;70(4):1081-6.
212. Czito BG, Bendell JC, Willett CG, Morse MA, Blobe GC, Tyler DS, et al. Bevacizumab, oxaliplatin, and capecitabine with radiation therapy in rectal cancer: Phase I trial results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Jun 1;68(2):472-8.
213. Resch G, De Vries A, Ofner D, Eisterer W, Rabl H, Jagoditsch M, et al. Preoperative treatment with capecitabine, bevacizumab and radiotherapy for primary locally advanced rectal cancer--a two stage phase II clinical trial. *Radiother Oncol*. 2012 Jan;102(1):10-3.
214. Kennecke H, Berry S, Wong R, Zhou C, Tankel K, Easaw J, et al. Pre-operative bevacizumab, capecitabine, oxaliplatin and radiation among patients with locally advanced or low rectal cancer: a phase II trial. *Eur J Cancer*. 2012 Jan;48(1):37-45.
215. Avallone A. Circulating endothelial cells and FDG-PET for early prediction of response in high-risk locally advanced rectal cancer patients treated with two different schedules of bevacizumab in combination with preoperative chemo-radiotherapy. *Proc ECCO-ESMO*. 2009:6117.
216. Dipetrillo T, Pricolo V, Lagares-Garcia J, Vrees M, Klipfel A, Cataldo T, et al. Neoadjuvant bevacizumab, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and radiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Jan 1;82(1):124-9.
217. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer*. 2012 Feb 1;118(3):628-38.
218. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):979-94.
219. Park IJ, Choi GS, Lim KH, Kang BM, Jun SH. Serum carcinoembryonic antigen monitoring after curative resection for colorectal cancer: clinical significance of the preoperative level. *Ann Surg Oncol*. 2009 Nov;16(11):3087-93.
220. Das P, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Feig BW, Chang GJ, Wolff RA, et al. Predictors of tumor response and downstaging in patients who receive preoperative chemoradiation for rectal cancer. *Cancer*. 2007 May 1;109(9):1750-5.
221. Moreno Garcia V, Cejas P, Blanco Codesido M, Feliu Batlle J, de Castro Carpeno J, Belda-Iniesta C, et al. Prognostic value of carcinoembryonic antigen level in rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Colorectal Dis*. 2009 Jul;24(7):741-8.
222. Lanza G, Gafa R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006 May 20;24(15):2359-67.

223. Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK, Tripp SR, Caan BJ, Slattery ML. Microsatellite instability and survival in rectal cancer. *Cancer Causes Control*. 2009 Nov;20(9):1763-8.
224. Schmidt-Ullrich RK, Valerie K, Fogleman PB, Walters J. Radiation-induced autophosphorylation of epidermal growth factor receptor in human malignant mammary and squamous epithelial cells. *Radiat Res*. 1996 Jan;145(1):81-5.
225. Lammering G, Valerie K, Lin PS, Mikkelsen RB, Contessa JN, Feden JP, et al. Radiosensitization of malignant glioma cells through overexpression of dominant-negative epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*. 2001 Mar;7(3):682-90.
226. Schmidt-Ullrich RK, Valerie KC, Chan W, McWilliams D. Altered expression of epidermal growth factor receptor and estrogen receptor in MCF-7 cells after single and repeated radiation exposures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994 Jul 1;29(4):813-9.
227. Lammering G, Hewit TH, Hawkins WT, Contessa JN, Reardon DB, Lin PS, et al. Epidermal growth factor receptor as a genetic therapy target for carcinoma cell radiosensitization. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Jun 20;93(12):921-9.
228. Bengala C, Bettelli S, Bertolini F, Sartori G, Fontana A, Malavasi N, et al. Prognostic role of EGFR gene copy number and KRAS mutation in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Br J Cancer*. 2010 Sep 28;103(7):1019-24.
229. Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, Brandslund I, Jakobsen A. Prediction of response to chemoradiation in rectal cancer by a gene polymorphism in the epidermal growth factor receptor promoter region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Oct 1;66(2):500-4.
230. Bertolini F, Bengala C, Losi L, Pagano M, Iachetta F, Dealis C, et al. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Aug 1;68(5):1455-61.
231. Giralt J, de las Heras M, Cerezo L, Eraso A, Hermosilla E, Velez D, et al. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol*. 2005 Feb;74(2):101-8.
232. Giralt J, Eraso A, Armengol M, Rossello J, Majo J, Ares C, et al. Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002 Dec 1;54(5):1460-5.
233. Kim JS, Kim JM, Li S, Yoon WH, Song KS, Kim KH, et al. Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Sep 1;66(1):195-200.
234. Zlobec I, Vuong T, Compton CC, Lugli A, Michel RP, Hayashi S, et al. Combined analysis of VEGF and EGFR predicts complete tumour response in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Br J Cancer*. 2008 Jan 29;98(2):450-6.
235. Zhang W, Park DJ, Lu B, Yang DY, Gordon M, Groshen S, et al. Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clin Cancer Res*. 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):600-5.
236. Balboa E, Duran G, Lamas MJ, Gomez-Caamano A, Celeiro-Munoz C, Lopez R, et al. Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: high incidence of somatic mutations and their relation with response. *Pharmacogenomics*. 2010 Jun;11(6):747-61.
237. Korkeila E, Jaakkola PM, Syrjanen K, Sundstrom J, Pyrhonen S. Preoperative radiotherapy downregulates the nuclear expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in rectal cancer. *Scand J Gastroenterol*. 2010 Mar;45(3):340-8.
238. Korkeila EA, Sundstrom J, Pyrhonen S, Syrjanen K. Carbonic anhydrase IX, hypoxia-inducible factor-1alpha, ezrin and glucose transporter-1 as predictors of disease outcome in rectal cancer: multivariate Cox survival models following data reduction by principal component analysis of the clinicopathological predictors. *Anticancer Res*. 2011 Dec;31(12):4529-35.
239. Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Okugawa Y, Fujikawa H, Matsushita K, et al. Prognostic significance of glucose transporter-1 (GLUT1) gene expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Surg Today*. 2012 May;42(5):460-9.
240. Havelund BM, Sorensen FB, Lindebjerg J, Spindler KL, Jakobsen A. Pretreatment HIF-1alpha and GLUT-1 expressions do not correlate with outcome after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Anticancer Res*. 2011 May;31(5):1559-65.

241. Qiu H, Sirivongs P, Rothenberger M, Rothenberger DA, Garcia-Aguilar J. Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Dis Colon Rectum*. 2000 Apr;43(4):451-9.
242. Min BS, Choi YJ, Pyo HR, Kim H, Seong J, Chung HC, et al. Cyclooxygenase-2 expression in pretreatment biopsy as a predictor of tumor responses after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *Arch Surg*. 2008 Nov;143(11):1091-7; discussion 7.
243. Tanaka M, Bedrosian I, Chang GJ, You YN, Das P, Li D, et al. Correlation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of hypoxia-related genes with pathologic complete response (pCR) following neoadjuvant chemoradiation (chemoXRT) for locally advanced rectal cancer. *ASCO Meeting Abstracts*. 2010 June 14, 2010;28(15\_suppl):3643.
244. Chang HJ, Jung KH, Kim DY, Jeong SY, Choi HS, Kim YH, et al. Bax, a predictive marker for therapeutic response to preoperative chemoradiotherapy in patients with rectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2005 Apr;36(4):364-71.
245. Kuremsky JG, Tepper JE, McLeod HL. Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Jul 1;74(3):673-88.
246. Lin LC, Lee HH, Hwang WS, Li CF, Huang CT, Que J, et al. p53 and p27 as predictors of clinical outcome for rectal-cancer patients receiving neoadjuvant therapy. *Surg Oncol*. 2006 Dec;15(4):211-6.
247. Spitz FR, Giacco GG, Hess K, Larry L, Rich TA, Janjan N, et al. p53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res*. 1997 Oct;3(10):1685-90.
248. Esposito G, Pucciarelli S, Alaggio R, Giacomelli L, Marchiori E, Iaderosa GA, et al. P27kip1 expression is associated with tumor response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2001 May;8(4):311-8.
249. Luna-Perez P, Arriola EL, Cuadra Y, Alvarado I, Quintero A. p53 protein overexpression and response to induction chemoradiation therapy in patients with locally advanced rectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 1998 Apr-May;5(3):203-8.
250. Kudrimoti M, Lee EY, Kang Y, Ahmed M, Mohiuddin M. Genetic markers predictive of response to induction chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancers. *J Ky Med Assoc*. 2007 Jan;105(1):18-22.
251. Jakob C, Liersch T, Meyer W, Becker H, Baretton GB, Aust DE. Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol*. 2008 Feb 21;14(7):1060-6.
252. Kim NK, Park JK, Lee KY, Yang WI, Yun SH, Sung J, et al. p53, BCL-2, and Ki-67 expression according to tumor response after concurrent chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2001 Jun;8(5):418-24.
253. Tannapfel A, Nusslein S, Fietkau R, Katalinic A, Kockerling F, Wittekind C. Apoptosis, proliferation, bax, bcl-2 and p53 status prior to and after preoperative radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998 Jun 1;41(3):585-91.
254. Reerink O, Karrenbeld A, Plukker JT, Verschueren RC, Szabo BG, Sluiter WJ, et al. Molecular prognostic factors in locally irresectable rectal cancer treated preoperatively by chemo-radiotherapy. *Anticancer Res*. 2004 Mar-Apr;24(2C):1217-21.
255. Terzi C, Canda AE, Sagol O, Atila K, Sonmez D, Fuzun M, et al. Survivin, p53, and Ki-67 as predictors of histopathologic response in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Colorectal Dis*. 2008 Jan;23(1):37-45.
256. Rau B, Sturm I, Lage H, Berger S, Schneider U, Hauptmann S, et al. Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 15;21(18):3391-401.
257. Charara M, Edmonston TB, Burkholder S, Walters R, Anne P, Mitchell E, et al. Microsatellite status and cell cycle associated markers in rectal cancer patients undergoing a combined regimen of 5-FU and CPT-11 chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res*. 2004 Sep-Oct;24(5B):3161-7.
258. Rodel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Bigalke M, Gunther K, Schick C, et al. Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002 Feb 1;52(2):294-303.
259. Debucquoy A, Goethals L, Geboes K, Roels S, Mc Bride WH, Haustermans K. Molecular responses of rectal cancer to preoperative chemoradiation. *Radiother Oncol*. 2006 Aug;80(2):172-7.



260. Debucquoy A, Libbrecht L, Roobrouck V, Goethals L, McBride W, Haustermans K. Morphological features and molecular markers in rectal cancer from 95 patients included in the European Organisation for Research and Treatment of Cancer 22921 trial: prognostic value and effects of preoperative radio (chemo) therapy. *Eur J Cancer*. 2008 Apr;44(6):791-7.
261. Smith FM, Reynolds JV, Kay EW, Crotty P, Murphy JO, Hollywood D, et al. COX-2 overexpression in pretreatment biopsies predicts response of rectal cancers to neoadjuvant radiochemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Feb 1;64(2):466-72.
262. Garcia VM, Batlle JF, Casado E, Burgos E, de Castro J, Belda C, et al. Immunohistochemical analysis of tumour regression grade for rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Colorectal Dis*. 2011 Sep;13(9):989-98.
263. Negri FV, Campanini N, Camisa R, Pucci F, Bui S, Ceccon G, et al. Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy or radiochemotherapy. *Br J Cancer*. 2008 Jan 15;98(1):143-7.
264. Gosens MJ, Dresen RC, Rutten HJ, Nieuwenhuijzen GA, van der Laak JA, Martijn H, et al. Preoperative radiochemotherapy is successful also in patients with locally advanced rectal cancer who have intrinsically high apoptotic tumours. *Ann Oncol*. 2008 Dec;19(12):2026-32.
265. Yamaguchi H, Bhalla K, Wang HG. Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/Diablo and Omi/HtrA2 release from mitochondria. *Cancer Res*. 2003 Apr 1;63(7):1483-9.
266. Scott N, Hale A, Deakin M, Hand P, Adab FA, Hall C, et al. A histopathological assessment of the response of rectal adenocarcinoma to combination chemo-radiotherapy: relationship to apoptotic activity, p53 and bcl-2 expression. *Eur J Surg Oncol*. 1998 Jun;24(3):169-73.
267. Okonkwo A, Musunuri S, Talamonti M, Benson A, 3rd, Small W, Jr., Stryker SJ, et al. Molecular markers and prediction of response to chemoradiation in rectal cancer. *Oncol Rep*. 2001 May-Jun;8(3):497-500.
268. Rodel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Weiss C, Gunther K, et al. High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkol*. 2002 Aug;178(8):426-35.
269. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet*. 2003 Jul 19;362(9379):205-9.
270. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5071-4.
271. Rodel F, Hoffmann J, Distel L, Herrmann M, Noisternig T, Papadopoulos T, et al. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res*. 2005 Jun 1;65(11):4881-7.
272. Sprenger T, Rodel F, Beissbarth T, Conradi LC, Rothe H, Homayounfar K, et al. Failure of downregulation of survivin following neoadjuvant radiochemotherapy in rectal cancer is associated with distant metastases and shortened survival. *Clin Cancer Res*. 2011 Mar 15;17(6):1623-31.
273. Yoon SM, Kim DY, Kim TH, Jung KH, Chang HJ, Koom WS, et al. Clinical parameters predicting pathologic tumor response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Nov 15;69(4):1167-72.
274. Sun YS, Zhang XP, Tang L, Ji JF, Gu J, Cai Y, et al. Locally advanced rectal carcinoma treated with preoperative chemotherapy and radiation therapy: preliminary analysis of diffusion-weighted MR imaging for early detection of tumor histopathologic downstaging. *Radiology*. 2010 Jan;254(1):170-8.
275. Calvo FA, Domper M, Matute R, Martinez-Lazaro R, Arranz JA, Desco M, et al. 18F-FDG positron emission tomography staging and restaging in rectal cancer treated with preoperative chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Feb 1;58(2):528-35.
276. Konski A, Li T, Sigurdson E, Cohen SJ, Small W, Jr., Spies S, et al. Use of molecular imaging to predict clinical outcome in patients with rectal cancer after preoperative chemotherapy and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 May 1;74(1):55-9.
277. Rosenberg R, Herrmann K, Gertler R, Kunzli B, Essler M, Lordick F, et al. The predictive value of metabolic response to preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer measured by PET/CT. *Int J Colorectal Dis*. 2009 Feb;24(2):191-200.
278. Dietz DW, Dehdashti F, Grigsby PW, Malyapa RS, Myerson RJ, Picus J, et al. Tumor hypoxia detected by positron emission tomography with 60Cu-ATSM as a predictor of response and survival in patients undergoing Neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal carcinoma: a pilot study. *Dis Colon Rectum*. 2008 Nov;51(11):1641-8.

279. Saw RP, Morgan M, Koorey D, Painter D, Findlay M, Stevens G, et al. p53, deleted in colorectal cancer gene, and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum*. 2003 Feb;46(2):192-202.
280. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res*. 2001 Dec;7(12):4096-101.
281. Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, Garcia-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E, et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 15;19(6):1779-86.
282. Tan BR, Thomas F, Myerson RJ, Zehnbauser B, Trinkaus K, Malyapa RS, et al. Thymidylate synthase genotype-directed neoadjuvant chemoradiation for patients with rectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2011 Mar 1;29(7):875-83.
283. Boskos CS, Liacos C, Korkolis D, Aygerinos K, Lamproglou I, Terpos E, et al. Thymidine phosphorylase to dihydropyrimidine dehydrogenase ratio as a predictive factor of response to preoperative chemoradiation with capecitabine in patients with advanced rectal cancer. *J Surg Oncol*. 2010 Oct 1;102(5):408-12.
284. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):1803-10.
285. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1757-65.
286. Au HJ, Karapetis CS, O'Callaghan CJ, Tu D, Moore MJ, Zalberg JR, et al. Health-related quality of life in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab: overall and KRAS-specific results of the NCIC CTG and AGITG CO.17 Trial. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 10;27(11):1822-8.
287. Erben P, Strobel P, Horisberger K, Popa J, Bohn B, Hanfstein B, et al. KRAS and BRAF mutations and PTEN expression do not predict efficacy of cetuximab-based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011 Nov 15;81(4):1032-8.
288. Debucquoy A, Haustermans K, Daemen A, Aydin S, Libbrecht L, Gevaert O, et al. Molecular response to cetuximab and efficacy of preoperative cetuximab-based chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 10;27(17):2751-7.
289. Duda DG, Willett CG, Ancukiewicz M, di Tomaso E, Shah M, Czito BG, et al. Plasma soluble VEGFR-1 is a potential dual biomarker of response and toxicity for bevacizumab with chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Oncologist*. 2010;15(6):577-83.
290. Folkvord S, Flatmark K, Dueland S, de Wijn R, Groholt KK, Hole KH, et al. Prediction of response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer by multiplex kinase activity profiling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Oct 1;78(2):555-62.
291. Saelen MG, Flatmark K, Folkvord S, de Wijn R, Rasmussen H, Fodstad O, et al. Tumor kinase activity in locally advanced rectal cancer: angiogenic signaling and early systemic dissemination. *Angiogenesis*. 2011 Dec;14(4):481-9.
292. Chen Z, Liu Z, Li W, Qu K, Deng X, Varma MG, et al. Chromosomal copy number alterations are associated with tumor response to chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Sep;50(9):689-99.
293. Garcia-Aguilar J, Chen Z, Smith DD, Li W, Madoff RD, Cataldo P, et al. Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Ann Surg*. 2011 Sep;254(3):486-92; discussion 92-3.
294. Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, Orntoft TF. Classification of Dukes' B and C colorectal cancers using expression arrays. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 May;129(5):263-71.
295. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene*. 2004 Feb 19;23(7):1377-91.
296. Mori Y, Selaru FM, Sato F, Yin J, Simms LA, Xu Y, et al. The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Res*. 2003 Aug 1;63(15):4577-82.
297. Mori Y, Yin J, Sato F, Sterian A, Simms LA, Selaru FM, et al. Identification of genes uniquely involved in frequent microsatellite instability colon carcinogenesis by expression profiling combined with epigenetic scanning. *Cancer Res*. 2004 Apr 1;64(7):2434-8.

298. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):1826-38.
299. Kim IJ, Lim SB, Kang HC, Chang HJ, Ahn SA, Park HW, et al. Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007 Sep;50(9):1342-53.
300. Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, Theisen J, Mages J, Becker K, et al. Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Jan;6(1):53-61.
301. Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3370-4.
302. Brettingham-Moore KH, Duong CP, Greenawalt DM, Heriot AG, Ellul J, Dow CA, et al. Pretreatment transcriptional profiling for predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):3039-47.
303. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15545-50.
304. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003 Jul;34(3):267-73.
305. Feliu J, Calvilio J, Escribano A, de Castro J, Sanchez ME, Mata A, et al. Neoadjuvant therapy of rectal carcinoma with UFT-leucovorin plus radiotherapy. *Ann Oncol*. 2002 May;13(5):730-6.
306. Gronholm M, Muranen T, Toby GG, Utermark T, Hanemann CO, Golemis EA, et al. A functional association between merlin and HEI10, a cell cycle regulator. *Oncogene*. 2006 Jul 27;25(32):4389-98.
307. Ohtsubo M, Okazaki H, Nishimoto T. The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol*. 1989 Oct;109(4 Pt 1):1389-97.
308. Nakamura J, Aoyagi S, Nanchi I, Nakatsuka S, Hirata E, Shibata S, et al. Overexpression of eukaryotic elongation factor eEF2 in gastrointestinal cancers and its involvement in G2/M progression in the cell cycle. *Int J Oncol*. 2009 May;34(5):1181-9.
309. Schreiber M, Muller WJ, Singh G, Graham FL. Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21(WAF1/CIP1) and p27KIP1 in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene*. 1999 Mar 4;18(9):1663-76.
310. Porte H, Chastre E, Prevot S, Nordlinger B, Empereur S, Basset P, et al. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J Cancer*. 1995 Feb 20;64(1):70-5.
311. Dahlberg M, Glimelius B, Graf W, Pahlman L. Preoperative irradiation affects functional results after surgery for rectal cancer: results from a randomized study. *Dis Colon Rectum*. 1998 May;41(5):543-9; discussion 9-51.
312. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, van de Velde CJ, van Krieken JH. Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma: not one millimeter but two millimeters is the limit. *Am J Surg Pathol*. 2002 Mar;26(3):350-7.
313. Glynne-Jones R, Mawdsley S, Novell JR. The clinical significance of the circumferential resection margin following preoperative pelvic chemo-radiotherapy in rectal cancer: why we need a common language. *Colorectal Dis*. 2006 Nov;8(9):800-7.
314. Mawdsley S, Glynne-Jones R, Grainger J, Richman P, Makris A, Harrison M, et al. Can histopathologic assessment of circumferential margin after preoperative pelvic chemoradiotherapy for T3-T4 rectal cancer predict for 3-year disease-free survival? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Nov 1;63(3):745-52.
315. Amat I, Belouqui R, del Llano P, Gomez-Dorronsoro M, Larrinaga B, Cordoba A, et al. [Comparative results of ganglion dissection in cancer of the rectum with and without prior treatment of the adipose tissue]. *An Sist Sanit Navar*. 2003 Sep-Dec;26(3):433-5.
316. Baxter NN, Morris AM, Rothenberger DA, Tepper JE. Impact of preoperative radiation for rectal cancer on subsequent lymph node evaluation: a population-based analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Feb 1;61(2):426-31.

317. Govindarajan A, Gonen M, Weiser MR, Shia J, Temple LK, Guillem JG, et al. Challenging the feasibility and clinical significance of current guidelines on lymph node examination in rectal cancer in the era of neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol*. 2011 Dec 1;29(34):4568-73.
318. Garcia-Aguilar J, Smith DD, Avila K, Bergsland EK, Chu P, Krieg RM. Optimal timing of surgery after chemoradiation for advanced rectal cancer: preliminary results of a multicenter, nonrandomized phase II prospective trial. *Ann Surg*. 2011 Jul;254(1):97-102.
319. Losi L, Luppi G, Gavioli M, Iachetta F, Bertolini F, D'Amico R, et al. Prognostic value of Dworak grade of regression (GR) in patients with rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis*. 2006 Oct;21(7):645-51.
320. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer*. 1994 Jun 1;73(11):2680-6.
321. Vecchio FM, Valentini V, Minsky BD, Padula GD, Venkatraman ES, Balducci M, et al. The relationship of pathologic tumor regression grade (TRG) and outcomes after preoperative therapy in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Jul 1;62(3):752-60.
322. Martin ST, Heneghan HM, Winter DC. Systematic review and meta-analysis of outcomes following pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Br J Surg*. 2012 Feb 23.
323. Bieche I, Laurendeau I, Tozlu S, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, et al. Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay. *Cancer Res*. 1999 Jun 15;59(12):2759-65.
324. Ito H, Hiraiwa N, Sawada-Kasugai M, Akamatsu S, Tachikawa T, Kasai Y, et al. Altered mRNA expression of specific molecular species of fucosyl- and sialyl-transferases in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer*. 1997 May 16;71(4):556-64.
325. Kakisako K, Miyahara M, Uchino S, Adachi Y, Kitano S. Prognostic significance of c-myc mRNA expression assessed by semi-quantitative RT-PCR in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep*. 1998 Mar-Apr;5(2):441-5.
326. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirota M, Fleischmann A, et al. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest*. 2005 Aug;85(8):1040-50.
327. Mullins M, Perreard L, Quackenbush JF, Gauthier N, Bayer S, Ellis M, et al. Agreement in breast cancer classification between microarray and quantitative reverse transcription PCR from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Clin Chem*. 2007 Jul;53(7):1273-9.
328. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2817-26.
329. Chang JC, Makris A, Gutierrez MC, Hilsenbeck SG, Hackett JR, Jeong J, et al. Gene expression patterns in formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsies predict docetaxel chemosensitivity in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Mar;108(2):233-40.
330. Espinosa E, Vara JA, Redondo A, Sanchez JJ, Hardisson D, Zamora P, et al. Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 10;23(29):7278-85.
331. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8;366(10):883-92.
332. Sanchez-Freire V, Ebert AD, Kalisky T, Quake SR, Wu JC. Microfluidic single-cell real-time PCR for comparative analysis of gene expression patterns. *Nat Protoc*. 2012 May;7(5):829-38.
333. Stahlberg A, Bengtsson M. Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Methods*. 2010 Apr;50(4):282-8.
334. Cejas P, Lopez-Gomez M, Aguayo C, Madero R, Moreno-Rubio J, de Castro Carpeno J, et al. Analysis of the concordance in the EGFR pathway status between primary tumors and related metastases of colorectal cancer patients: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2012 Feb;12(2):124-31.
335. Velcich A, Palumbo L, Jarry A, Laboisie C, Racevskis J, Augenlicht L. Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ*. 1995 Jun;6(6):749-57.
336. Durual S, Blanchard C, Estienne M, Jacquier MF, Cuber JC, Perrot V, et al. Expression of human TFF3 in relation to growth of HT-29 cell subpopulations: involvement of PI3-K but not STAT6. *Differentiation*. 2005 Feb;73(1):36-44.

337. Xue H, Lu B, Zhang J, Wu M, Huang Q, Wu Q, et al. Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. *J Proteome Res.* 2010 Jan;9(1):545-55.
338. Vermeulen SJ, Chen TR, Speleman F, Nollet F, Van Roy FM, Mareel MM. Did the four human cancer cell lines DLD-1, HCT-15, HCT-8, and HRT-18 originate from one and the same patient? *Cancer Genet Cytogenet.* 1998 Nov;107(1):76-9.
339. Khatri P, Draghici S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics.* 2005 Sep 15;21(18):3587-95.
340. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:Article3.
341. Song S, Black MA. Microarray-based gene set analysis: a comparison of current methods. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:502.
342. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(1):1-13.
343. Sonachalam M, Shen J, Huang H, Wu X. Systems biology approach to identify gene network signatures for colorectal cancer. *Front Genet.* 2012;3:80.
344. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 9;338(1):617-26.
345. Rabinovitz I, Tsomo L, Mercurio AM. Protein kinase C-alpha phosphorylation of specific serines in the connecting segment of the beta 4 integrin regulates the dynamics of type II hemidesmosomes. *Mol Cell Biol.* 2004 May;24(10):4351-60.
346. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2010 Jan;10(1):9-22.
347. Daemi N, Vallet T, Thomasset N, Jacquier MF, Zebda N, Dore JF, et al. Expression of the alpha 6, beta 1 and beta 4 integrin subunits, basement membrane organization and proteolytic capacities in low and high metastatic human colon carcinoma xenografts. *Invasion Metastasis.* 1995;15(3-4):103-15.
348. Daemi N, Thomasset N, Lissitzky JC, Dumortier J, Jacquier MF, Pourreya C, et al. Anti-beta4 integrin antibodies enhance migratory and invasive abilities of human colon adenocarcinoma cells and their MMP-2 expression. *Int J Cancer.* 2000 Mar 15;85(6):850-6.
349. Frenzel A, Grespi F, Chmielewski W, Villunger A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis.* 2009 Apr;14(4):584-96.
350. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer.* 1998 Oct;78(8):986-92.
351. Mirjolet JF, Barberi-Heyob M, Didelot C, Peyrat JP, Abecassis J, Millon R, et al. Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *Br J Cancer.* 2000 Nov;83(10):1380-6.
352. Catz SD, Johnson JL. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene.* 2001 Nov 1;20(50):7342-51.
353. Mineva ND, Wang X, Yang S, Ying H, Xiao ZX, Holick MF, et al. Inhibition of RelB by 1,25-dihydroxyvitamin D3 promotes sensitivity of breast cancer cells to radiation. *J Cell Physiol.* 2009 Sep;220(3):593-9.
354. Hummel DM, Thiem U, Hobaus J, Mester I, Gober L, Stremnitzer C, et al. Prevention of preneoplastic lesions by dietary vitamin D in a mouse model of colorectal carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012 Sep 11.
355. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Feb;21(1):11-9.
356. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 2001 Apr 30;20(19):2390-400.
357. Hughes R, Parry J, Beynon J, Jenkins G. Molecular changes consistent with increased proliferation and invasion are common in rectal cancer. *Clin Transl Oncol.* 2011 Oct;13(10):753-9.
358. Tanos T, Marinissen MJ, Leskow FC, Hochbaum D, Martinetto H, Gutkind JS, et al. Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light. *J Biol Chem.* 2005 May 13;280(19):18842-52.
359. Toby GG, Gherraby W, Coleman TR, Golem EA. A novel RING finger protein, human enhancer of invasion 10, alters mitotic progression through regulation of cyclin B levels. *Mol Cell Biol.* 2003 Mar;23(6):2109-22.
360. Smith AP, Weeraratna AT, Spears JR, Meltzer PS, Becker D. SAGE identification and fluorescence imaging analysis of genes and transcripts in melanomas and precursor lesions. *Cancer Biol Ther.* 2004 Jan;3(1):104-9.

361. Singh MK, Nicolas E, Gherraby W, Dadke D, Lessin S, Golemis EA. HEI10 negatively regulates cell invasion by inhibiting cyclin B/Cdk1 and other promotility proteins. *Oncogene*. 2007 Jul 19;26(33):4825-32.
362. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Jul 15;59(4):928-42.
363. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jun;9(6):400-14.
364. Hotte GJ, Linam-Lennon N, Reynolds JV, Maher SG. Radiation sensitivity of esophageal adenocarcinoma: the contribution of the RNA-binding protein RNPC1 and p21-mediated cell cycle arrest to radioresistance. *Radiat Res*. 2012 Mar;177(3):272-9.
365. Stivala LA, Cazzalini O, Prosperi E. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21CDKN1A as a target of anti-cancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets*. 2012 Feb;12(2):85-96.
366. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 2007 Jun 1;129(5):865-77.
367. Bowers AJ, Boylan JF. Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors. *Gene*. 2004 Mar 17;328:135-42.
368. Fernandez-Martos C, Nogue M, Cejas P, Moreno-Garcia V, Machancoses AH, Feliu J. The role of capecitabine in locally advanced rectal cancer treatment: an update. *Drugs*. 2012 May 28;72(8):1057-73.
369. Goto T, Shinmura K, Yokomizo K, Sakuraba K, Kitamura Y, Shirahata A, et al. Expression levels of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and thymidine phosphorylase in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2012 May;32(5):1757-62.
370. Chiorean EG, Sanghani S, Schiel MA, Yu M, Burns M, Tong Y, et al. Phase II and gene expression analysis trial of neoadjuvant capecitabine plus irinotecan followed by capecitabine-based chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: Hoosier Oncology Group GI03-53. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012 May 18.
371. Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Koike Y, Okugawa Y, Yokoe T, et al. TS and DPD mRNA levels on formalin-fixed paraffin-embedded specimens as predictors for distant recurrence of rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *J Surg Oncol*. 2012 May;105(6):529-34.
372. Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9118-23.
373. Purton LE. Roles of retinoids and retinoic Acid receptors in the regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *PPAR Res*. 2007;2007:87934.
374. Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 1;103(31):11707-12.
375. Chen Y, Orlicky DJ, Matsumoto A, Singh S, Thompson DC, Vasilou V. Aldehyde dehydrogenase 1B1 (ALDH1B1) is a potential biomarker for human colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Feb 11;405(2):173-9.
376. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2009 Jun 15;15(12):4234-41.
377. Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*. 2011 May;40(5):1271-96.
378. Joseph J, Cardesa A, Carreras J. Creatine kinase activity and isoenzymes in lung, colon and liver carcinomas. *Br J Cancer*. 1997;76(5):600-5.
379. Mooney SM, Rajagopalan K, Williams BH, Zeng Y, Christudass CS, Li Y, et al. Creatine kinase brain overexpression protects colorectal cells from various metabolic and non-metabolic stresses. *J Cell Biochem*. 2011 Apr;112(4):1066-75.
380. Cersosimo RJ, Lee JM. Creatine kinase elevation associated with 5-fluorouracil and levamisole therapy for carcinoma of the colon. A case report. *Cancer*. 1996 Apr 1;77(7):1250-3.
381. Sidler D, Brockmann A, Mueller J, Nachbur U, Corazza N, Renzulli P, et al. Thiazolide-induced apoptosis in colorectal cancer cells is mediated via the Jun kinase-Bim axis and reveals glutathione-S-transferase P1 as Achilles' heel. *Oncogene*. 2011 Dec 12.

382. Townsend DM, Manevich Y, He L, Hutchens S, Pazoles CJ, Tew KD. Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem*. 2009 Jan 2;284(1):436-45.
383. Coles BF, Kadlubar FF. Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? *Biofactors*. 2003;17(1-4):115-30.
384. Miyake T, Nakayama T, Naoi Y, Yamamoto N, Otani Y, Kim SJ, et al. GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. *Cancer Sci*. 2012 May;103(5):913-20.
385. Funke S, Timofeeva M, Risch A, Hoffmeister M, Stegmaier C, Seiler CM, et al. Genetic polymorphisms in GST genes and survival of colorectal cancer patients treated with chemotherapy. *Pharmacogenomics*. 2010 Jan;11(1):33-41.
386. Kaul G, Pattan G, Rafeequi T. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochem Funct*. 2011 Apr;29(3):227-34.
387. Romero-Ruiz A, Bautista L, Navarro V, Heras-Garvin A, March-Diaz R, Castellano A, et al. Prolyl hydroxylase-dependent modulation of eukaryotic elongation factor 2 activity and protein translation under acute hypoxia. *J Biol Chem*. 2012 Mar 16;287(12):9651-8.
388. McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Aug;2(8):589-94.
389. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2005 Jun 16;352(24):2487-98.
390. Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, Ballestrero A, Brossart P. Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia*. 2007 Jan;21(1):30-6.
391. Hong YS, Hong SW, Kim SM, Jin DH, Shin JS, Yoon DH, et al. Bortezomib induces G2-M arrest in human colon cancer cells through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1. *Int J Oncol*. 2012 Jul;41(1):76-82.
392. Kozuch PS, Rocha-Lima CM, Dragovich T, Hochster H, O'Neil BH, Atiq OT, et al. Bortezomib with or without irinotecan in relapsed or refractory colorectal cancer: results from a randomized phase II study. *J Clin Oncol*. 2008 May 10;26(14):2320-6.
393. Wang ZJ, Taylor F, Churchman M, Norbury G, Tomlinson I. Genetic pathways of colorectal carcinogenesis rarely involve the PTEN and LKB1 genes outside the inherited hamartoma syndromes. *Am J Pathol*. 1998 Aug;153(2):363-6.
394. Nosho K, Kawasaki T, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Zepf D, et al. PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia*. 2008 Jun;10(6):534-41.
395. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 2009 Mar 1;69(5):1851-7.
396. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):554.
397. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, et al. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res*. 2001 Oct 15;61(20):7426-9.
398. Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, et al. The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science*. 2007 Dec 14;318(5857):1744-8.
399. Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, et al. Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science*. 2007 Jul 13;317(5835):239-42.
400. Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, et al. Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer Cell*. 2009 Dec 8;16(6):463-74.
401. Fu Y, Zhang Q, Kang C, Zhang J, Zhang K, Pu P, et al. Inhibitory effects of adenovirus mediated Akt1 and PIK3R1 shRNA on the growth of malignant tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*. 2009 Jun;8(11):1002-9.
402. Dijt FJ, Fichtinger-Schepman AM, Berends F, Reedijk J. Formation and repair of cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts. *Cancer Res*. 1988 Nov 1;48(21):6058-62.
403. Park CH, Sancar A. Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 24;91(11):5017-21.

404. Youn CK, Kim MH, Cho HJ, Kim HB, Chang IY, Chung MH, et al. Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents. *Cancer Res.* 2004 Jul 15;64(14):4849-57.
405. Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S. Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer.* 2003 Jan;39(1):112-9.
406. Boyer J, McLean EG, Aroori S, Wilson P, McCulla A, Carey PD, et al. Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin Cancer Res.* 2004 Mar 15;10(6):2158-67.
407. Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2001 Dec 1;19(23):4298-304.
408. Uchida K, Danenberg PV, Danenberg KD, Grem JL. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, ERCC1, and thymidine phosphorylase gene expression in primary and metastatic gastrointestinal adenocarcinoma tissue in patients treated on a phase I trial of oxaliplatin and capecitabine. *BMC Cancer.* 2008;8:386.
409. Chan N, Bristow RG. "Contextual" synthetic lethality and/or loss of heterozygosity: tumor hypoxia and modification of DNA repair. *Clin Cancer Res.* 2010 Sep 15;16(18):4553-60.
410. Fakih MG, Bullarddunn K, Yang GY, Pendyala L, Toth K, Andrews C, et al. Phase II study of weekly intravenous oxaliplatin combined with oral daily capecitabine and radiotherapy with biologic correlates in neoadjuvant treatment of rectal adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 Nov 1;72(3):650-7.
411. Dagleish R. The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jan 1;25(1):181-7.
412. Li AQ, Si JM, Shang Y, Gan LH, Guo L, Zhou TH. [Construction of COL1A1 short hairpin RNA vector and its effect on cell proliferation and migration of gastric cancer cells]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2010 May;39(3):257-63.
413. Lin ZY, Chuang WL. Genes responsible for the characteristics of primary cultured invasive phenotype hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Pharmacother.* 2012 May 9.
414. Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Mar;44(3):480-8.
415. Isler SG, Schenk S, Bendik I, Schraml P, Novotna H, Moch H, et al. Genomic organization and chromosomal mapping of SPARC-like 1, a gene down regulated in cancers. *Int J Oncol.* 2001 Mar;18(3):521-6.
416. McClung HM, Thomas SL, Osenkowski P, Toth M, Menon P, Raz A, et al. SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neurosci Lett.* 2007 May 29;419(2):172-7.
417. Nischt R, Wallich M, Reibetanz M, Baumann P, Krieg T, Mauch C. BM-40 and MMP-2 expression are not coregulated in human melanoma cell lines. *Cancer Lett.* 2001 Jan 26;162(2):223-30.
418. Gilles C, Bassuk JA, Pulyaeva H, Sage EH, Foidart JM, Thompson EW. SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5529-36.
419. Lussier C, Sodek J, Beaulieu JF. Expression of SPARC/osteonectin/BM40 in the human gut: predominance in the stroma of the remodeling distal intestine. *J Cell Biochem.* 2001;81(3):463-76.
420. Volmer MW, Radacz Y, Hahn SA, Klein-Scory S, Stuhler K, Zapatka M, et al. Tumor suppressor Smad4 mediates downregulation of the anti-adhesive invasion-promoting matricellular protein SPARC: Landscaping activity of Smad4 as revealed by a "secretome" analysis. *Proteomics.* 2004 May;4(5):1324-34.
421. Yang E, Kang HJ, Koh KH, Rhee H, Kim NK, Kim H. Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *Int J Cancer.* 2007 Aug 1;121(3):567-75.
422. Liang JF, Wang HK, Xiao H, Li N, Cheng CX, Zhao YZ, et al. Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:71.
423. Chew A, Salama P, Robbshaw A, Klopac B, Zeps N, Platell C, et al. SPARC, FOXP3, CD8 and CD45 correlation with disease recurrence and long-term disease-free survival in colorectal cancer. *PLoS One.* 2011;6(7):e22047.
424. Cheetham S, Tang MJ, Mesak F, Kennecke H, Owen D, Tai IT. SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'-deoxycytidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *Br J Cancer.* 2008 Jun 3;98(11):1810-9.
425. Lemercinier X, Muskett FW, Cheeseman B, McIntosh PB, Thim L, Carr MD. High-resolution solution structure of human intestinal trefoil factor and functional insights from detailed structural comparisons with the other members of the trefoil family of mammalian cell motility factors. *Biochemistry.* 2001 Aug 14;40(32):9552-9.



426. Regalo G, Wright NA, Machado JC. Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Dec;62(24):2910-5.
427. Chinery R, Cox HM. Modulation of epidermal growth factor effects on epithelial ion transport by intestinal trefoil factor. *Br J Pharmacol*. 1995 May;115(1):77-80.
428. Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem*. 2007 May;55(5):505-13.
429. Sasaki M, Tsuneyama K, Saito T, Kataoka H, Mollenhauer J, Poustka A, et al. Site-characteristic expression and induction of trefoil factor family 1, 2 and 3 and malignant brain tumor-1 in normal and diseased intrahepatic bile ducts relates to biliary pathophysiology. *Liver Int*. 2004 Feb;24(1):29-37.
430. Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL, Oates P, Murgue B, De-Baumont M, et al. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem*. 1993 Jun 5;268(16):12230.
431. dos Santos Silva E, Ulrich M, Doring G, Botzenhart K, Gott P. Trefoil factor family domain peptides in the human respiratory tract. *J Pathol*. 2000 Feb;190(2):133-42.
432. Wiede A, Hinz M, Canzler E, Franke K, Quednow C, Hoffmann W. Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res*. 2001 Jan;303(1):109-15.
433. Shi HS, Yin X, Song L, Guo QJ, Luo XH. Neuropeptide Trefoil factor 3 improves learning and retention of novel object recognition memory in mice. *Behav Brain Res*. 2012 Feb 1;227(1):265-9.
434. Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Sep;4(9):721-32.
435. Plaut AG. Trefoil peptides in the defense of the gastrointestinal tract. *N Engl J Med*. 1997 Feb 13;336(7):506-7.
436. Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*. 1996 Oct 11;274(5285):262-5.
437. Al-azze ED, Fegert P, Blin N, Gott P. Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Feb 29;1490(3):324-32.
438. Beck S, Sommer P, dos Santos Silva E, Blin N, Gott P. Hepatocyte nuclear factor 3 (winged helix domain) activates trefoil factor gene TFF1 through a binding motif adjacent to the TATAA box. *DNA Cell Biol*. 1999 Feb;18(2):157-64.
439. Al-azze E, Dittrich O, Vervoorts J, Blin N, Gott P, Luscher B. Gastroprotective peptide trefoil factor family 2 gene is activated by upstream stimulating factor but not by c-Myc in gastrointestinal cancer cells. *Gut*. 2002 Nov;51(5):685-90.
440. Dossinger V, Kayademir T, Blin N, Gott P. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem*. 2002;12(4):197-206.
441. Baus-Loncar M, Al-azze ED, Romanska H, Lalani el N, Stamp GW, Blin N, et al. Transcriptional control of TFF3 (intestinal trefoil factor) via promoter binding sites for the nuclear factor kappaB and C/EBPbeta. *Peptides*. 2004 May;25(5):849-54.
442. Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, et al. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2003 Jan;9(1):19-33.
443. Furuta GT, Turner JR, Taylor CT, Hershberg RM, Comerford K, Narravula S, et al. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J Exp Med*. 2001 May 7;193(9):1027-34.
444. Ribieras S, Lefebvre O, Tomasetto C, Rio MC. Mouse Trefoil factor genes: genomic organization, sequences and methylation analyses. *Gene*. 2001 Mar 21;266(1-2):67-75.
445. Chinery R, Cox HM. Immunoprecipitation and characterization of a binding protein specific for the peptide, intestinal trefoil factor. *Peptides*. 1995;16(4):749-55.
446. Familiari M, Cook GA, Taupin DR, Marryatt G, Yeomans ND, Giraud AS. Trefoil peptides are early markers of gastrointestinal maturation in the rat. *Int J Dev Biol*. 1998 Sep;42(6):783-9.
447. LeSimple P, van Seuningen I, Buisine MP, Copin MC, Hinz M, Hoffmann W, et al. Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Mar;36(3):296-303.
448. Cook GA, Familiari M, Thim L, Giraud AS. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett*. 1999 Jul 30;456(1):155-9.

449. Chinery R, Playford RJ. Combined intestinal trefoil factor and epidermal growth factor is prophylactic against indomethacin-induced gastric damage in the rat. *Clin Sci (Lond)*. 1995 Apr;88(4):401-3.
450. Playford RJ, Wright NA, Marchbank T. Endogenous peptides and peptide therapy in gut defense and repair. *Drug News Perspect*. 2000 Aug;13(6):330-6.
451. Andoh A, Kinoshita K, Rosenberg I, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor induces decay-accelerating factor expression and enhances the protective activities against complement activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 2001 Oct 1;167(7):3887-93.
452. Babyatsky MW, deBeaumont M, Thim L, Podolsky DK. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology*. 1996 Feb;110(2):489-97.
453. McKenzie C, Thim L, Parsons ME. Topical and intravenous administration of trefoil factors protect the gastric mucosa from ethanol-induced injury in the rat. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000 Aug;14(8):1033-40.
454. Graness A, Chwierski CE, Reinhold D, Thim L, Hoffmann W. Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *J Biol Chem*. 2002 May 24;277(21):18440-6.
455. Kato K, Chen MC, Nguyen M, Lehmann FS, Podolsky DK, Soll AH. Effects of growth factors and trefoil peptides on migration and replication in primary oxyntic cultures. *Am J Physiol*. 1999 May;276(5 Pt 1):G1105-16.
456. Oertel M, Graness A, Thim L, Buhling F, Kalbacher H, Hoffmann W. Trefoil factor family-peptides promote migration of human bronchial epithelial cells: synergistic effect with epidermal growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Oct;25(4):418-24.
457. Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest*. 1994 Jul;94(1):376-83.
458. Liu D, el-Hariry I, Karayiannakis AJ, Wilding J, Chinery R, Kmiot W, et al. Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Lab Invest*. 1997 Dec;77(6):557-63.
459. Kinoshita K, Taupin DR, Itoh H, Podolsky DK. Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul;20(13):4680-90.
460. Taupin D, Podolsky DK. Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology*. 1999 May;116(5):1072-80.
461. Chen YH, Lu Y, De Plaen IG, Wang LY, Tan XD. Transcription factor NF-kappaB signals antianoinic function of trefoil factor 3 on intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug 11;274(3):576-82.
462. Rodrigues S, Nguyen QD, Faivre S, Bruyneel E, Thim L, Westley B, et al. Activation of cellular invasion by trefoil peptides and src is mediated by cyclooxygenase- and thromboxane A2 receptor-dependent signaling pathways. *FASEB J*. 2001 Jul;15(9):1517-28.
463. Emami S, Le Floch N, Bruyneel E, Thim L, May F, Westley B, et al. Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. *FASEB J*. 2001 Feb;15(2):351-61.
464. Jiang GX, Zhong XY, Cui YF, Liu W, Tai S, Wang ZD, et al. IL-6/STAT3/TFF3 signaling regulates human biliary epithelial cell migration and wound healing in vitro. *Mol Biol Rep*. 2010 Dec;37(8):3813-8.
465. Durer U, Hartig R, Bang S, Thim L, Hoffmann W. TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(5):329-46.
466. Meyer zum Buschenfelde D, Tauber R, Huber O. TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression. *Peptides*. 2006 Dec;27(12):3383-90.
467. Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, et al. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J*. 2003 Jan;17(1):7-16.
468. Rivat C, Rodrigues S, Bruyneel E, Pietu G, Robert A, Redeuilh G, et al. Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) -- and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res*. 2005 Jan 1;65(1):195-202.
469. Guleng B, Han J, Yang JQ, Huang QW, Huang JK, Yang XN, et al. TFF3 mediated induction of VEGF via hypoxia in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Mol Biol Rep*. 2012 Apr;39(4):4127-34.
470. Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, et al. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides*. 2004 May;25(5):885-98.

471. Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 18;97(2):799-804.
472. Dhar DK, Wang TC, Tabara H, Tonomoto Y, Maruyama R, Tachibana M, et al. Expression of trefoil factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6472-8.
473. Meng JR, Tang HZ, Zhou KZ, Shen WH, Guo HY. TFF3 and survivin expressions associate with a lower survival rate in gastric cancer. *Clin Exp Med*. 2012 Sep 21.
474. Yamachika T, Werther JL, Bodian C, Babyatsky M, Tatematsu M, Yamamura Y, et al. Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002 May;8(5):1092-9.
475. Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene*. 2006 Jun 29;25(28):3994-4008.
476. Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 20;102(38):13550-5.
477. Kannan N, Kang J, Kong X, Tang J, Perry JK, Mohankumar KM, et al. Trefoil factor 3 is oncogenic and mediates anti-estrogen resistance in human mammary carcinoma. *Neoplasia*. 2010 Dec;12(12):1041-53.
478. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001 Aug 23;412(6849):822-6.
479. Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, et al. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):5974-8.
480. Luo J, Duggan DJ, Chen Y, Sauvageot J, Ewing CM, Bittner ML, et al. Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4683-8.
481. Qu Y, Yang Y, Ma D, Xiao W. Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer. *Oncol Rep*. 2012 Apr;27(4):1277-83.
482. Kosriwong K, Menheniott TR, Giraud AS, Jearanaikoon P, Sriipa B, Limpai boon T. Trefoil factors: tumor progression markers and mitogens via EGFR/MAPK activation in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2011 Mar 28;17(12):1631-41.
483. Muenphon K, Limpai boon T, Jearanaikoon P, Pairojkul C, Sriipa B, Bhudhisawasdi V. Amplification of chromosome 21q22.3 harboring trefoil factor family genes in liver fluke related cholangiocarcinoma is associated with poor prognosis. *World J Gastroenterol*. 2006 Jul 14;12(26):4143-8.
484. Patel MR, Bryson PC, Shores CG, Hart CF, Thorne LB, Deal AM, et al. Trefoil factor 3 immunohistochemical characterization of follicular thyroid lesions from tissue microarray. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Jun;135(6):590-6.
485. Khoury T, Chadha K, Javle M, Donohue K, Levea C, Iyer R, et al. Expression of intestinal trefoil factor (TFF-3) in hepatocellular carcinoma. *Int J Gastrointest Cancer*. 2005;35(3):171-7.
486. Okada H, Kimura MT, Tan D, Fujiwara K, Igarashi J, Makuuchi M, et al. Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*. 2005 Feb;26(2):369-77.
487. Yio X, Zhang JY, Babyatsky M, Chen A, Lin J, Fan QX, et al. Trefoil factor family-3 is associated with aggressive behavior of colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis*. 2005;22(2):157-65.
488. Babyatsky M, Lin J, Yio X, Chen A, Zhang JY, Zheng Y, et al. Trefoil factor-3 expression in human colon cancer liver metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(2):143-51.
489. Efstathiou JA, Noda M, Rowan A, Dixon C, Chinery R, Jawhari A, et al. Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):3122-7.
490. John R, El-Rouby NM, Tomasetto C, Rio MC, Karam SM. Expression of TFF3 during multistep colon carcinogenesis. *Histol Histopathol*. 2007 Jul;22(7):743-51.
491. Lombardo MF, De Angelis F, Bova L, Bartolini B, Bertuzzi F, Nano R, et al. Human placental lactogen (hPL-A) activates signaling pathways linked to cell survival and improves insulin secretion in human pancreatic islets. *Islets*. 2011 Sep-Oct;3(5):250-8.
492. Bermudez VP, Farina A, Raghavan V, Tappin I, Hurwitz J. Studies on human DNA polymerase epsilon and GINS complex and their role in DNA replication. *J Biol Chem*. 2011 Aug 19;286(33):28963-77.

493. Fong S, Debs RJ, Desprez PY. Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. *Trends Mol Med.* 2004 Aug;10(8):387-92.
494. Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 1999 Jul 9;274(28):19838-45.
495. O'Brien CA, Kreso A, Ryan P, Hermans KG, Gibson L, Wang Y, et al. ID1 and ID3 regulate the self-renewal capacity of human colon cancer-initiating cells through p21. *Cancer Cell.* 2012 Jun 12;21(6):777-92.
496. Strumane K, Bonnomet A, Stove C, Vandenbroucke R, Nawrocki-Raby B, Bruyneel E, et al. E-cadherin regulates human Nanos1, which interacts with p120ctn and induces tumor cell migration and invasion. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):10007-15.
497. Bonnomet A, Polette M, Strumane K, Gilles C, Dalstein V, Kileztky C, et al. The E-cadherin-repressed hNanos1 gene induces tumor cell invasion by upregulating MT1-MMP expression. *Oncogene.* 2008 Jun 12;27(26):3692-9.
498. Sakamoto K, Imanishi Y, Tomita T, Shimoda M, Kameyama K, Shibata K, et al. Overexpression of SIP1 and downregulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy. *Ann Surg Oncol.* 2012 Feb;19(2):612-9.
499. Liu L, Guo Z, Tieu Q, Castle A, Castle D. Role of secretory carrier membrane protein SCAMP2 in granule exocytosis. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4266-78.
500. Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y. Expression profiles of MUC mucins and trefoil factor family (TFF) peptides in the intrahepatic biliary system: physiological distribution and pathological significance. *Prog Histochem Cytochem.* 2007;42(2):61-110.
501. Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. *Cell Cycle.* 2009 Sep 1;8(17):2708-10.
502. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer.* 2008 Jan;8(1):61-70.
503. Xia F, Altieri DC. Mitosis-independent survivin gene expression in vivo and regulation by p53. *Cancer Res.* 2006 Apr 1;66(7):3392-5.
504. Knutsen A, Adell G, Sun XF. Survivin expression is an independent prognostic factor in rectal cancer patients with and without preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Sep 1;60(1):149-55.
505. Casado E, Garcia VM, Sanchez JJ, Gomez Del Pulgar MT, Feliu J, Maurel J, et al. Upregulation of Trefoil Factor 3 (TFF3) After Rectal Cancer Chemoradiotherapy Is an Adverse Prognostic Factor and a Potential Therapeutic Target. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Dec 1;84(5):1151-8.
506. Bignotti E, Ravaggi A, Tassi RA, Calza S, Rossi E, Falchetti M, et al. Trefoil factor 3: a novel serum marker identified by gene expression profiling in high-grade endometrial carcinomas. *Br J Cancer.* 2008 Sep 2;99(5):768-73.
507. Vestergaard EM, Borre M, Poulsen SS, Nexø E, Tørring N. Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):807-12.
508. Aikou S, Ohmoto Y, Gunji T, Matsushashi N, Ohtsu H, Miura H, et al. Tests for serum levels of trefoil factor family proteins can improve gastric cancer screening. *Gastroenterology.* 2011 Sep;141(3):837-45 e1-7.
509. Kaise M, Miwa J, Tashiro J, Ohmoto Y, Morimoto S, Kato M, et al. The combination of serum trefoil factor 3 and pepsinogen testing is a valid non-endoscopic biomarker for predicting the presence of gastric cancer: a new marker for gastric cancer risk. *J Gastroenterol.* 2011 Jun;46(6):736-45.
510. Solmi R, De Sanctis P, Zucchini C, Ugolini G, Rosati G, Del Governatore M, et al. Search for epithelial-specific mRNAs in peripheral blood of patients with colon cancer by RT-PCR. *Int J Oncol.* 2004 Oct;25(4):1049-56.
511. Chan MW, Chan VY, Leung WK, Chan KK, To KF, Sung JJ, et al. Anti-sense trefoil factor family-3 (intestinal trefoil factor) inhibits cell growth and induces chemosensitivity to adriamycin in human gastric cancer cells. *Life Sci.* 2005 Apr 15;76(22):2581-92.
512. Peterson DE, Barker NP, Akhmadullina LI, Rodionova I, Sherman NZ, Davidenko IS, et al. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study of recombinant human intestinal trefoil factor oral spray for prevention of oral mucositis in patients with colorectal cancer who are receiving fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 10;27(26):4333-8.
513. Rosen LS, Abdi E, Davis ID, Gutheil J, Schnell FM, Zalberg J, et al. Palifermin reduces the incidence of oral mucositis in patients with metastatic colorectal cancer treated with fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2006 Nov 20;24(33):5194-200.